UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES



MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DE CLAVEL

DOCENTE: Dr. POCOMUCHA POMA, Vicente Serapio

CURSO: MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS

ALUMNO: PONCE MASGO Cristian Antony

TINGO MARÍA

2021

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido ampliamente utilizadas con éxito en el mundo para la micropropagacion y la eliminación de virus en el clavel, la embriogénesis somática se ha empleado como una nueva altenativa en los métodos de propagación ofreciendo una alta tasa de multiplicación en un espacio limitado y en breve tiempo; tiene inmensas perspectivas de uso, manteniéndose en la mayoría de los casos la estabilidad del material obtenido; aunque no está totalmente dilucidada, y poco se conoce de los eventos morfohistologicos, bioquímicos y moleculares que tienen lugar cuando las células somáticas se vuelven competentes para producir embriones somáticos. Una de las etapas más difíciles y cruciales en el proceso embriogénico es la sincronización de poblaciones embriogénicas homogéneas, así como la búsqueda de marcadores tempranos relacionados con el potencial embriogénico que permitan predecir la formación del embrión somático antes de que esté presente, especialmente al inicio del cultivo donde el número de células embriogénicas es pequeño y debe ser relacionado para obtener frecuencias de regeneración adecuadas

Los claveles constituyen una de las flores más cotizadas a nivel internacional debido a su belleza, su duración después de cortados y su posibilidad de florecer todo el año. De aquí que el presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar los métodos, técnicas y análisis que se realizan en un cultivo in citro para *Dianthus caryophyllus*, la aplicación de técnicas de cultivo in vitro de tejidos en plantas ornamentales es una alternativa que permite suministrar al floricultor material vegetal revigorizado (rejuvenecimiento) y con condiciones fitosanitarias adecuadas para enraizamiento y producción de esquejes para multiplicación masiva.

I. OBJETIVOS

- Determinar los distintos métodos de micropropagación en clavel.
- Conocer los métodos de desinfección utilizados en la micropropagación de clavel.
- Conocer los tipos de explantes utilizados en la micropropagación de clavel.
- Conocer los medios de cultivo utilizados en la micropropagación de clavel.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. CULTIVO IN VITRO

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales se ha extendido para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos como el de células y órganos, dentro de un grupo de técnicas que se fundamentan en varios principios. Entre estos principios, los más importantes son la totipotencialidad celular, propuesta por (Haberlandt, 1902), "todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas"; y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog (1975), Las técnicas de cultivo in vitro han contribuido a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular y a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas (Debergh y Zimmerman, 1991). Así surgen diferentes usos de las técnicas de cultivo in vitro: - Micropropagación.

- Obtención de plantas libres de virus y patógenos
- Conservación de germoplasma
- Mejora genética

2.2. MICROPROPAGACIÓN

El término micropropagación se definió por primera vez en 1986 como “cualquier proceso aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de sus órganos, de sus tejidos o de sus células y que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente”. De una forma más genérica se puede definir como la “propagación de genotipos seleccionados usando técnicas de cultivo in vitro”. Las técnicas de cultivo in vitro que teóricamente se pueden emplear en la micropropagación se dividen en:

- Micropropagación axilar: a partir de yemas axilares se forman directamente vástagos.
- Micropropagación adventicia: mediante la formación de vástagos adventicios y/o de embriones somáticos. Este tipo de micropropagación se puede dividir en; Directa multiplicación a partir de piezas de tejidos u órganos (explantos) obtenidos directamente de la planta madre, es decir, en ausencia de proliferación de callo (masa celular sin diferenciación aparente). Indirecta; en la que la formación de callo es un paso previo al desarrollo de estructuras organizadas: vástagos y/o embriones.

2.3. ETAPAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

2.3.1. ETAPA 0, PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad

ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante. La planta donante debe elegirse en base a una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explanto a establecer en condiciones in vitro. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos.

El empleo de explantes que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo in vitro. Se recomienda colectar explantes primarios a campo durante la estación primaveral y estival, cuando existe una brotación activa de las yemas, ya que el empleo de yemas en estado de dormición ocasiona serios problemas de contaminación.

A fin de lograr explantos de óptimas calidades conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible incidir directamente sobre el estado sanitario y la calidad de los explantos mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento. Para especies ornamentales tropicales y subtropicales se recomienda mantener las plantas donantes en condiciones de alta temperatura (25ºC) y baja humedad relativa (75%) a fin de reducir la proliferación de patógenos.

Los procesos morfogénicos de floración, dormición y bulbificación son controlados por el fotoperiodo y la temperatura. Controlando estos factores también es posible obtener plantas donantes y explantes más homogéneos durante todo el año. Pueden aplicarse además pretratamientos con reguladores

de crecimiento a las plantas donantes, así como también a los explantes mismos. En especies leñosas suele utilizarse como pretratamiento la inmersión de los explantos primarios en soluciones con citocininas a fin de inducir la brotación de yemas.

2.3.2. ETAPA 1 - INICIACIÓN DEL CULTIVO.

Una vez seleccionadas las plantas (aquellas que posean unas características fenotípicas deseadas) se requiere desinfectar superficialmente el material escogido para evitar que en el medio de cultivo crezcan microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan inicialmente por las características del explante; en la práctica tienen que ser establecidas de forma exacta mediante el método de ensayo y error.

2.3.3. ETAPA 2 - MULTIPLICACIÓN.

El objetivo de esta fase es inducir la multiplicación de los explantos mediante la formación de nuevas estructuras a través de la vía elegida (axilar o adventicia, embriogenética, etc.). En esta fase se producen nuevos brotes o propágulos que cuando son separados del cultivo son capaces de formar una planta, pudiendo usarse como el inicio de otro ciclo de multiplicación con el fin de aumentar su número.

2.3.4. ETAPA 3 - INDUCCIÓN Y DESARROLLO DE RAÍCES

En esta fase se produce la formación de raíces adventicias. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones in vitro como ex vitro. En el primer caso se transfieren los brotes obtenidos en la etapa anterior a un medio libre de

reguladores de crecimiento o que sólo contenga auxinas. Esta operación se realiza en condiciones de esterilidad (en cabina de flujo). En el segundo caso los brotes se sumergen en una solución concentrada de auxinas y se transfieren a un sustrato limpio, no necesariamente estéril, que puede ser una mezcla de turba con perlita o vermiculita. Los brotes que se utilicen en el enraizamiento ex vitro deben ser vigorosos y poseer hojas bien desarrolladas, ya que las plantas deben realizar la fotosíntesis para obtener la energía necesaria para desarrollarse y formar las raíces. El enraizamiento ex vitro permite que la fase de enraizamiento y la fase de aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base alta de los explantes, asegurando así una conexión vascular, continua entre el vástago y la raíz. En la actualidad esta técnica permite reducir entre un 35 y 75% los costes totales de la micropropagación (Kane, 2005), lo que la convierte en altamente deseable para la industria dedicada a la producción de plantas.

2.3.5. ETAPA 4 – ACLIMATACIÓN

Las plantas cultivadas en condiciones in vitro poseen habitualmente estomas no funcionales y cutículas poco desarrolladas debido a la alta humedad relativa en el interior del frasco de cultivo y a la escasa realización de la fotosíntesis. Bajo las condiciones de cultivo in vitro los explantes son mixotróficos, casi no fotosintetizan y su necesidad de carbono orgánico lo suplen con los azúcares añadidos al medio. Por tanto, antes de transferirlas a las condiciones externas deben sufrir un proceso de acondicionamiento gradual: protección a la luz y control de la transpiración estomática y cuticular

2.4. MEDIOS DE CULTIVO

Existen especies en las cuales el establecimiento, multiplicación y/o enraizamiento de los cultivos es dificultoso y se requiere una intensa tarea experimental para lograr su micropropagación o para obtener callos o suspensiones capaces de producir los metabolitos deseados. Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción (Krikorian, 1991).

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales in vitro (Heller, 1953, 1954; Murashige & Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk & Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular. Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio en concentraciones variables entre 3 y 50 mM. Cuando estas

fuentes son suplementadas en forma individual se afectan, generalmente en forma negativa, tanto el crecimiento del cultivo como la producción de metabolitos (Ertola et al., 1994). Pero, dado que el uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunos explantos crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido (Krikorian, 1991), recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico como el succinato como agente bufferante. En el ítem 5.2.2. se presentan ejemplos de la influencia de las concentraciones de nitrato y amonio sobre la producción de metabolitos secundarios. Muchas células vegetales son sensibles a los niveles de fosfatos en el medio. Precisamente, el mantenimiento de los niveles de fosfato por debajo del óptimo para el crecimiento estimula entre 3 y 4 veces la acumulación de cinamoil-putrescina en cultivos de suspensiones de Nicotiana tabacum (Schiel et al., 1984) e incrementa la síntesis de alcaloides en Catharanthus roseus (Misawa, 1985). Habitualmente, los fosfatos son almacenados en la vacuola y adquiridos desde allí para el crecimiento, mientras que la concentración necesaria de fosfato indicada en los diferentes medios de cultivo varía entre 0,1 y 1,5 mM. Generalmente se agrega calcio en mayores concentraciones que en los medios microbianos, variando entre 1 y 3 mM. El hierro es esencial para el crecimiento celular y se agrega al medio de cultivo en una concentración de 0,01 a 0,15 mM. Se aconseja la utilización del quelato Fe-EDTA que aumenta la solubilidad del hierro. La naturaleza y concentración de los micronutrientes empleados en los medios de cultivo surgen principalmente de resultados empíricos al evaluar la capacidad de cada elemento de afectar el crecimiento. En general el boro, el manganeso, el iodo y el cinc se utilizan en concentraciones variables entre 1 y 100 mM, mientras que el resto de los

micronutrientes se agregan en valores inferiores a 0,1 mM. No hay un estudio sistemático de su influencia en el crecimiento y la productividad, aunque existen varios trabajos puntuales como los referidos a la estimulación de la producción de shikonina al aumentar 30 veces el ión cobre (Fujita et al., 1981), al incremento de la producción de compuestos fenólicos por deficiencia de boro (Ertola et al., 1994) y a la mejor formación y calidad de callos de caña de azúcar al incrementar el calcio y el magnesio (Gomez Kosky, 1998a). Huang y Murashige (1977) y Dixon (1985) realizaron estudios comparativos de la composición salina de varios medios comerciales de cultivo de tejidos vegetales, destacando que: 1) el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) presenta altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio; 2) el medio B5 (Gamborg et al., 1968) se caracteriza por una alta concentración de nitrato de potasio; 3) los medios MS y SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) presentan altas concentraciones de sales comparados con el medio de White (1963); 4) los medios MS y SH contienen hierro formando un quelato con EDTA, mientras que en los medios de White (1963) y de Heller (1953) está como sulfato y cloruro férrico, respectivamente. Si bien las plantas son autótrofas, puede ser necesario añadir al medio de cultivo algunas vitaminas hasta que los cultivos prosperen. Las vitaminas favorecedoras del desarrollo de cultivos in vitro y que se añaden rutinariamente en la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico (Krikorian, 1991). Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B2), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico. El ácido ascórbico (vitamina C) se considera benéfico en algunos casos, pero problablemente debido más a su capacidad reductora que a su papel como vitamina.

1.1. Reguladores de crecimiento

Los reguladores del crecimiento vegetal son sustancias que actúan sobre el desarrollo de las plantas y que, por lo general, son activas a concentraciones muy pequeñas. Dentro de este grupo de moléculas podemos diferenciar entre las que son producidas por la planta y aquellas de origen sintético. Las que se encuentran de forma natural en las plantas se denominan fitohormonas u hormonas vegetales.

1.1.1. Auxinas

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos in vitro. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α-naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido p-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2- oxiacético). En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula (Abel & Theologis, 1996). La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las

concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1995).

1.1.2. Citoquininas

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citoquininas sintéticas y las dos últimas naturales. Las citoquininas in vivo incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas (Salisbury & Ross, 1994). La eficiencia comparativa de dos citoquininas (BA y 2-iP) en igual concentración sobre la propagación in vitro de Paeonia suffruticosa fue estudiada por Bouza et al. (1993). Los explantos cultivados en BA desarrollan nuevas hojas y yemas axilares asegurando una buena multiplicación vegetativa, mientras que el desarrollo de los explantos cultivados en 2-iP fue escaso. Las respuestas anteriores fueron correlacionadas con los niveles endógenos de AIA y ABA (ácidos abscísico), observando que altas concentraciones de BA se asociaron con baja producción de AIA y que el ABA se produce más tardíamente en los explantos tratados con BA que en los cultivados con 2-iP. Estos resultados indican que un mismo tejido reacciona de modo diferente ante el estímulo hormonal, aun cuando se trate de compuestos relacionados. La inclusión de citoquininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas. La proporción entre auxinas y citoquininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citoquininas a

través de diseños factoriales para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos (Krikorian, 1995). Además de las citoquininas derivadas de adenina, se han detectado una serie de fenilureas sustituidas que tienen similar actividad y son utilizados como citoquininas en algunos protocolos de cultivo de tejidos vegetales (Krikorian, 1995; Christianson & Hornbuckle, 1999). Tales compuestos son el tidiazuron (TDZ), la N, N'-difenilurea (DPU) y la cloropiridilfenilurea (CPPU). El hecho que no se hayan obtenido mutantes de ninguna especie vegetal que sean auxina- o citocinina-deficientes indica que estos dos reguladores de crecimiento son indispensables para el crecimiento vegetal, lo que llevó a Gray & Estelle (1998) a postular que tales mutantes serían embriogénica y/o gametofíticamente letales.

1.1.3. Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998). Se han identificado 64 GAs exclusivos de plantas superiores, 12 GAs que están presentes sólo en hongos del género Gibberella y 13 tipos de GAs que se aislan de ambos grupos. Tanto en Giberella como en angiospermas se han aislado varios tipos de GAs simultáneamente (Sponsel, 1995). Las GAs se sintetizan a partir de ácido mevalónico en tallos jóvenes y en semillas en desarrollo. Permiten superar la latencia de semillas y brotes, promueven la floración y retardan la senescencia. Los variados efectos de las giberelinas sugieren que tienen más de un sitio de

acción primario. Así, si sólo se considera la elongación del tallo en plantas completas, ésta es el resultado de al menos tres acontecimientos coadyuvantes: 1) estímulo de la división celular de las células meristemáticas del ápice del tallo, 2) promoción de la hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa originando monosacáridos que proporcionen energía vía respiración, contribuyan a la formación de la pared celular y disminuyan el potencial hídrico de la célula y 3) incremento de la plasticidad de la pared celular, permitiendo la elongación celular (Salibury & Ross, 1994). A pesar de la gran cantidad de efectos fisiológicos de las GAs, su uso en los medios de cultivo no está muy difundido. En algunos casos, como en cultivos de zanahoria, se ha demostrado que el GA3 afecta más la división que el crecimiento celular (Krikorian, 1995). En cultivos productores de metabolitos secundarios puede afectar la producción tanto en los niveles como en su concentración relativa; tal es el caso de los cultivos de raíces transformadas de Brugmansia candida, en los cuales el suplemento de GA3 reduce la acumulación de alcaloides del tropano y altera significativamente la concentración relativa (Rhodes et al., 1994).

1.1.4. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un regulador de crecimiento cuya tasa de biosíntesis se modifica significativamente frente al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas, etc. El ABA provoca respuestas que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas. Estas características pueden utilizarse en cultivo in vitro para

producir metabolitos de reacción al estrés, para retrasar el crecimiento y para moderar los efectos de auxinas y citocininas (Salibury & Ross, 1994).

1.1.5. Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides son un tipo de polihidroxiesteroides de lactona con estructura base de brasinólida que comenzaron a ser investigados a principios de la década de 1970, cuando se dio su descubrimiento en extractos de polen pertenecientes a la especie vegetal Brassica napus L. Su estructura base comparte grandes similitudes con las hormonas esteroides animales y dentro del reino vegetal se han encontrado en una gran cantidad de especies. Dentro de la fisiología vegetal cumple diferentes funciones debido a que se encuentran involucrados en la regulación del metabolismo y señalización celular vegetal, por lo que tienen diferentes efectos en la regulación y desarrollo del crecimiento de las plantas. Entre estas, principalmente se encuentran el control de la elongación y división celular, el crecimiento de la raíz, la regulación de la fotomorfogénesis, la diferenciación de estomas y sistema vascular, la germinación de semillas, la elongación de vástago vegetal y otro tipo de funciones relacionadas con el control de la inmunidad y reproducción. Pueden a su vez disminuir en gran medida los cambios de estrés provocados por factores bióticos y abióticos dentro del medio. En la actualidad se han encontrado más de 70 tipos diferentes de análogos naturales con similitud a la brasinólida, que dentro de la regulación vegetal tienen un papel sumamente importante en el control de procesos como la producción de etileno, resistencia a estrés ambiental, respuesta gravitrópica de la raíz, entre otras funcionalidades. Los brasinoesteorides se han encontrado en diferentes organismos que presentan cierto tipo de características vegetales como algas y plantas ancestrales, por lo que se cree que es una de las hormonas

más antiguas dentro del reino vegetal y mayormente pueden encontrarse en altas concentraciones en diferentes tipos de órganos vegetales como en el polen, semillas inmaduras, raíces y flores (1-100 ng/g), presentándose en brotes y hojas vegetales, pero en una menor concentración. Su síntesis comienza en el retículo endoplasmático y su precursor se conoce como campesterol, sumado al hecho de que puede ser sintetizado por las plantas por medio de ruta metabólica de oxidación tardía y una de oxidación temprana. Se sabe que la aplicación exógena de diferentes tipos de brasinoesteorides puede emplearse en el mejoramiento de la germinación de semillas e inducir la promoción del crecimiento de hipocotíleos, cotiledones, láminas de las hojas, elongación de raíz lateral y diferenciación del meristemo apical (todo ello depende de la concentración del metabolito dentro de la especie vegetal).

2.5. LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Todo laboratorio mantiene en su interior cierta cantidad de bacterias y de microorganismos en el ambiente que pueden llegar a afectar la salud de las personas que laboran en ellos. Cuando los procedimientos higiénicos son realizados de manera óptima por medio de una buena limpieza y desinfección de los materiales se logra mantener un procedimiento experimental muy prometedor.

Los materiales de laboratorio pueden llegar a ser desinfectados por dos procesos, uno químico y uno físico. Los medios físicos para poder desinfectar incluyen el calor, los rayos UV y la limpieza. Los materiales que se utilizan dentro del lugar son introducidos en líquidos que se mantienen a una temperatura por debajo de su punto de ebullición, también puede utilizarse el vapor para realizar la desinfección.

Otro de los métodos más comunes para realizar este proceso es por medio del lavado utilizando agua y detergente; de hecho, en la actualidad existen tipo de lavadores especiales donde los instrumentos pueden ser colocados, en los cuales el agua puede ser regulada.

El proceso de secado en este tipo de aparatos es por lo general automática, por otro lado, los métodos de desinfección química utilizan una serie de sustancias que sirven para bloquear la función de las células de los microorganismos permanentemente. Podemos señalar que algunos agentes químicos desinfectantes más destacados son, el hipoclorito de sodio, etanol y peróxido de hidrógeno. Es importante recalcar que cada uno de los instrumentos utilizados en el laboratorio debe de ser desinfectado de forma individual.

1.1.5.1. Conceptos generales

a) Esterilización: Proceso que destruye toda forma de vida microbiana. Un objeto estéril (en sentido microbiológico) está libre de microorganismos vivos.
b) Desinfección: Es la destrucción, inactivación o remoción de aquellos microorganismos que pueden causar infección u ocasionar otros efectos indeseables; la desinfección no implica necesariamente esterilización.
c) Desinfectante: Agente usualmente químico, que mata las formas en crecimiento de los microorganismos, pero no necesariamente las esporas. El término se refiere a sustancias utilizadas sobre objetos inanimados.
d) Antiséptico: Sustancia que impide el crecimiento o la acción de los microorganismos, ya sea destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento y actividad. Se aplica sobre superficies corporales.

e) Sanitarizante: Agente que reduce la población microbiana a niveles seguros, según los requerimientos de salud pública. Se aplica en objetos inanimados de uso diario, por ejemplo, utensilios y equipos para manipular alimentos, vasos, platos y otros objetos de uso similar.
f) Germicida: Agente que mata a los microorganismos, pero no necesariamente a sus esporas.
g) Bactericida: Agente que mata a las bacterias.
h) Bacteriostático: Agente que inhibe el crecimiento de las bacterias, mientras permanece en contacto con ellas.
i) Fungicida: Agente que mata los hongos.
j) Fungistático: Agente que inhibe el crecimiento de los hongos, mientras permanece en contacto con ellos.
k) Virucida: Agente que destruye los virus.

1.1.5.2. Organización del área de desinfección y limpieza

Los diseños del área de limpieza y esterilización para tratar los materiales de laboratorio desechados deben incluir autoclaves, un trituradora, una unidad de eliminación de basura conectada por tubería de plomo al alcantarillado público, fregaderos hondos, máquinas para lavar material de vidrio, estufas de desecación, estufas de esterilización y mesas grandes de acero inoxidable.

Estas habitaciones deben tener disposición adecuada para evitar cualquier posible mezcla de materiales contaminados y descontaminados. Los arquitectos deben trabajar, por tanto, sobre un diagrama de flujo o un plano de vías críticas, tomando especial cuidado en la eliminación del vapor de la autoclave.

El material contaminado llega en sus recipientes de color codificado a una bancada o una zona designada y utilizada únicamente para este fin. Se separan seguidamente de acuerdo con su color y se envían al incinerador o se cargan en la autoclave. No hay ningún cruce en esta zona. Tras la esterilización en la autoclave, los contenedores se llevan a la mesa de separación.

Antes de ser esterilizado a la autoclave, deben quitarse las tapas desechables y después incluidas en la carga de la autoclave de manera que no dificulten la penetración del vapor. Deben quitarse las ligaduras de las bolsas de plástico y abrir por completo las bolsas en las cestas o cubos que las mantienen.

1.1.5.3. Métodos de desinfección y esterilización

1.1.5.3.1. Calor húmedo

El Autoclave es el aparato más comúnmente utilizado en los laboratorios para esterilizar cultivos y soluciones que no se desnaturalicen a temperaturas mayores a 100℃. Una temperatura de 121 ℃ (15 Lbs de presión) con un tiempo de exposición de 15 minutos sirve para destruir microorganismos, incluso los formadores de esporas.

a) Ventajas del calor húmedo:

- Rápido calentamiento y penetración.
- Destrucción de bacterias y esporas en corto tiempo.
- No deja residuos tóxicos.
- Hay un bajo deterioro del material expuesto.
- Económico.

b) Desventajas del Calor Húmedo:

- No permite esterilizar soluciones que formen emulsiones con el agua.
- Es corrosivo sobre ciertos instrumentos metálicos.

c) Materiales que se pueden esterilizar con vapor: Material textil - Material de vidrio - Material de goma- Instrumental quirúrgico de acero inoxidable- Soluciones acuosas - Todo aquel material cuyo fabricante certifique pueda ser esterilizado por vapor.

d) Materiales que no se pueden esterilizar con vapor: Sustancias oleosas- Sustancias grasas- Polvos- Instrumental quirúrgico cromado o niquelado- Artículos eléctricos sin cobertura especial- Todo material que no tolera la exposición al calor y a la humedad.

1.1.5.3.2. Calor seco

Todos los microorganismos son susceptibles en distinto grado, a la acción del calor. El calor provoca en ellos coagulación y desnaturalización de sus proteínas. La efectividad del calor como método de esterilización depende de:

- Temperatura
- Tiempo de exposición

La estufa de esterilización (Horno), es el artefacto utilizado en los laboratorios para esterilizar por calor seco. Se requiere mayor temperatura y tiempo de exposición que la autoclave. La temperatura varía entre 120° y 180℃, requiriéndose distintos tiempos de exposición. A 140℃ se necesitan por lo menos 5 horas de exposición, mientras que a 160℃ se requieren al menos 2 horas de exposición.

a) Ventajas del Calor Seco:

- No es corrosivo para metales e instrumentos.
- Permite la esterilización de sustancias en polvo y no acuosas, y de sustancias viscosas no volátiles.

b) Desventajas del Calor Seco:

- Requiere mayor tiempo de esterilización, respecto al calor húmedo, debido a la baja penetración del calor.

c) Materiales que pueden esterilizarse por calor seco: Instrumental quirúrgico cromado- Materiales de vidrio, aluminio o porcelana- Aceites, parafina, sustancias grasas, vaselina- Polvos (talco).

d) Materiales que no se pueden esterilizar por calor seco

- Material textil (algodón, sedas, lino, etc.)

- Gomas - Materiales sintéticos - Todo material que se altere a la temperatura trabajo.

2.6. PROPAGACIÓN DE CLAVEL

La propagación del clavel se realiza principalmente mediante esquejes procedentes de plantas madre y por micro propagación in vitro. La multiplicación por semilla solo se emplea para hibridaciones.

2.7. METODOS DE PROPAGACION DE CLAVEL

2.7.1. PROPAGACIÓN POR ESQUEJES

Esta técnica se realiza tomando esquejes de plantas madre cultivadas en invernaderos independientes con extremas medidas de sanidad vegetal.

Para que un esqueje sea de buena calidad, se debe obtener de la parte media del tallo (debido a que los nudos basales son menos vegetativos y los superiores dan lugar a un crecimiento prematuro) con una longitud de 10cm aproximadamente y con 5-6 pares de hojas. La consistencia de los esquejes no debe ser ni excesivamente leñosa ni excesivamente herbácea. Los esquejes de plantas madre jóvenes enraízan más rápidamente y su desarrollo es mejor. Los límites de duración del cultivo para plantas madre se encuentran entre doce y

quince meses como máximo. Una vez recolectados, se deben colocar en invernaderos de multiplicación con instalación fog-system para mantener la humedad relativa en torno al 95% y sobre sustrato esterilizado a una temperatura de 20ºC aproximadamente. En estas condiciones, el enraizado tiene lugar a las tres semanas.

Los esquejes, también se pueden conservar en frío (0,5-1ºC). La duración del almacenaje es de unos 15 días para esquejes enraizados y de 2 meses para no enraizados.

2.7.2. Propagación por semilla

Las semillas se pueden sembrar en un semillero, solo debes espolvorearlas en la parte superior del sustrato y cubrirlas ligeramente. El riego en el semillero se debe realizar con la ayuda de un pulverizador; y posteriormente se cubre el semillero con una bolsa de plástico transparente para crear un efecto invernadero.

Las plantas en el semillero deben ser trasplantadas a sus macetas cuando presentes de dos a tres hojas. Si quieres trasplantarlas al aire libre debes hacerlo cuando midan de 4 a 5 pulgadas; también se puede sembrar claveles desde sus semillas en el lugar definitivo, aunque lo más recomendado es hacerlo en semilleros para ganar tiempo y facilitar su manejo. La profundidad para colocar las semillas al aire libre es de 1/8 de pulgada. Otro punto a tener en cuenta es que el suelo debe estar bien drenado, también debe asegurarte de mantener un suelo húmedo, pero no encharcado. Una vez las plantas de claveles sean lo suficientemente resistentes se deben colocar a una separación de 12 cm,

dejando únicamente las plantas más fuertes. Tas en el semillero deben ser trasplantadas a sus macetas cuando presentes de dos a tres hojas. Si quieres trasplantarlas al aire libre debes hacerlo cuando midan de 4 a 5 pulgadas.

2.7.3. Propagación in vitro

El clavel se propaga de preferencia en forma vegetativa lo cual permite conservarlas características fenotípicas durante su propagación por varias generaciones, sin embargo, esta modalidad de propagación acarrea el problema de ser causante de diseminar enfermedades sistémicas originadas por virus y micoplasmas. El clavel fue propagado por primera vez utilizando brotes apicales en un medio líquido empleando la fitohormona 6-Bencylaminopurina en concentraciones de 5 a 10 mg/L, esta hormona ha sido empleada para propagar plantas de carácter agroindustrial de un alto valor económico, tales como: espárrago, piña, vid, fresa, arroz, caña de azúcar, camu camu, etc. Empleando diferentes concentraciones según la especie y el explante empleado, (4,5,6,7,8,9,10,11,12). La técnica de micro propagación frecuentemente llamada técnica in-vitro (en frasco); se denomina asó debido a la obtención y manejo de plántulas en miniatura y en un gran número que se originan de un explante de una planta madre (hoja, raíz, tallo, ovario, óvulo, polen, etc.).

III. METODOLOGÍA

Se revisaron una porción de artículos de investigación acerca de la micropropagación de *Dhianthus caryophyllus* (Clavel), con ellos se pudo conocer los distintos métodos que existen para la micropropropagación del clavel, métodos de desinfección, tipos de explante, medios de cultivo, y los procesos estadístcos utilizados.

IV. RESULTADOS

Tabla N° 1, Tipos de explante utilizados en la propagación.

N°	TÍTULO	EXPLANTE	AUTOR	AÑO	LINK
1	Análisis comparativo de entre las diferentes metodologías de micropropagación de variedades de clavel (*Dianthus caryophillus L.*)	Semillas, callos, meristemos, segmentos de hojas, micro esquejes, embriones somáticos	GUEVARA VALENCIA, Marina	2004	https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/47312/GuevaraValenciaMarina.pdf?sequence=1&isAllowed=y
2	Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus L.* "clavel"	Meristemos	AFANADOR PEREZ, Ana María	2005	https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8740/tesis68%20%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y
3	Efecto de 6-bencylaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación in vitro de yemas de *Dianthus caryophyllus L.* "clavel"	yemas	NORBERTO RODRÍGUEZ, Carlos PRETEL SEVILLANO, Orlando REYNA SÁNCHEZ, Wilson MERCADO PAREDES, Doris	2007	https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v04n2/pdf/a05v4n2.pdf

4	Comportamiento in vitro de tres variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y reducción de la fase de enraizamiento para la obtención de plantas madres	Yemas	QUISPE FLORES, Celia Roberta	2007	https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5102/T-1169.pdf?sequence=1&isAllowed=y
5	Cultivo de meristemos en clavel (*Dianthus caryophillus*)	Yemas, axilar y apical	-GUEVARA V., Marina -BARNEY, Humberto -VILLEGAS G. Thelma L.	2007	https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XII/CXII-37.pdf
6	Un protocolo eficiente para la propagación in vitro de clavel (*Dianthus caryophyllus*)	Meristemos	-AAMIR ALI -HUMERA AFRASIAB -SHAGUFTA NAZ -MAMOONA RAUF -JAVED IQBAL	2008	https://www.researchgate.net/publication/216321465_An_Efficient_Protocol_for_In_vitro_Propagation_of_Carnation_Dianthus_caryophyllus
7	Micropropagación de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) con el empleo de Biobrás-16	Semillas	CASTILLA VALDÉS, Yanelis	2008	https://aprenderly.com/doc/2785764/micropropagaci%C3%B3n-de-clavel-espa%C3%B1ol--dianthus-caryophyllus ...

8	In Vitro Propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus L.*)	Segmentos nodales	-José L. CASAS -Enrique OLMOS -Abel PIQUERAS	2010	https://www.researchgate.net/publication/321617037_Protocols_for_In_Vitro_Propagation_of_Ornamental_Plants
9	Organogénesis directa en medio líquido en clavel en un biorreactor de bajo costo	Segmentos nodales	-MONROY ÁLVAREZ, Ingrid Elizabeth -FILGUEIRA DUARTE,Juan José	2010	https://www.researchgate.net/profile/Juan-Filguiera/publication/277269933_Organogenesis_directa_en_medio_liquido_en_clavel_en_un_bioreactor_de_bajo_costo/links/5a2547630f7e9b71dd0785a5/Organogenesis-directa-en-medio-liquido-en-clavel-en-un-bioreactor-de-bajo-costo.pdf

10	Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de plantas obtenidas por cultivo De meristemo	Vitroplantas	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María Esther	2011	http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas44/2NOTAS_44_2.pdf
11	Desarrollo de sistemas para la propagación masiva del clavel (*Dianthus caryophillis L.*) y del ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) A través del cultivo de tejidos vegetales	Meristemo	PÉREZ REYES, Martha Evelia GUTIÉRREZ CAMPOS, Rafael PÉREZ MOLPHE, Eugenio LIZALDE VIRAMONTES, Hugo	2012	https://investigacion.uaa.mx/RevistalyC/archivo/revista8/Articulo%208.pdf
12	Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*), micropropagadas con biobras-16	Vitroplantas	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María E. -LARA RODRIGUEZ, Regla M.	2013	http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v35n1/ctr10114.pdf
13	Conservación in vitro del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de sales minerales	Vitroplantas	-JIMENEZ MARIÑA, Liudmila -SILVA PUPO, Juan José -BORGES GARCIA, Misterbino -FONSECA ARIAS, Milvia	2015	https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212016000100177

14	Efecto de tres enraizantes en la propagación asexual de esquejes de clavel (Dianthus caryophyllus, L.) en condiciones de invernadero	Esquejes	NEYRA LOPEZ, Mary Rossana	2018	https://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/2868/TESIS-2018-AGRONOM%C3%8DA-NEYRA%20LOPEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y
15	Propagación y conservación in vitro de clavel (Dianthus ssp.)	Esquejes	FONSECA CARRASCO, Yanexis BAHÍ AREVICH, Marisel SILVA PUPO, Juan José	2020	https://revistas.udg.co.cu/index.php/redel/article/view/1695/3040

16	Efectividad de dos métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*)	Semillas	CASTILLA VALDES, Yanelis GONZALES VEGA, Maria Esther	2007	https://www.researchgate.net/profile/Yanelis-Castilla/publication/282769573_Efectividad_de_dos_metodos_de_desinfeccion_en_el_establecimiento_in_vitro_de_semillas_de_clavel_espanol_Dianthus_caryophyllus_L/links/572a3a0508aef7c7e2c4f541/Efectividad-de-dos-metodos-de-desinfeccion-en-el-establecimiento-in-vitro-de-semillas-de-clavel-espanol-Dianthus-caryophyllus-L.pdf

Tabla N° 2, Tipos de Materiales y equipos utilizados en la propagación.

N°	TÍTULO	MATERIALES Y EQUIPOS	AUTOR	AÑO	LINK
1	Análisis comparativo de entre las diferentes metodologías de micropropagación de variedades de clavel (*Dianthus caryophillus L.*)	-Explantes -Medio Murashige y Skoog -Medio de Gamborg -Cámara de flujo -Sustratos -Autoclave -Pinzas -Bisturí -Matraz -Papel filtro Placas Petri	GUEVARA VALENCIA, Marina	2004	https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/47312/GuevaraValenciaMarina.pdf?sequence=1&isAllowed=y

2	Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus L.* “clavel”	-Explantes -Sustratos -Fitotron -Pathoscreen Kit -Soluciones	AFANADOR PEREZ, Ana María	2005	https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8740/tesis68.pdf?sequence=1&isAllowed=y
3	Efecto de 6-bencylaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación in vitro de yemas de *Dianthus caryophyllus L.* “clavel”	-Bisturí -Pinzas -Cámara de flujo -Explantes -Frascos de vídrio - Medio Murashige y Skoog	NORBERTO RODRÍGUEZ, Carlos PRETEL SEVILLANO, Orlando REYNA SÁNCHEZ, Wilson MERCADO PAREDES, Doris	2007	http://revistas.ucv.edu.pe/index.php/REVISTAMEDICAVALLEJIANA/article/view/2237/1904

4	Comportamiento in vitro de tres variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y reducción de la fase de enraizamiento para la obtención de plantas madres	-Tubos de ensayo -Cajas Petri -Vasos -Pinzas -Bisturí - Medio Murashige y Skoog -Balanza analítica	QUISPE FLORES, Celia Roberta	2007	https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5102/T-1169.pdf?sequence=1&isAllowed=y
5	Cultivo de meristemos en clavel (*Dianthus caryophillus*)	-Explantes -Soluciones reguladores de crecimiento	-GUEVARA V., Marina -BARNEY, Humberto -VILLEGAS G. Thelma L.	2007	https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XII/CXII-37.pdf

6	Un protocolo eficiente para la propagación in vitro de clavel (*Dianthus caryophyllus*)	-Explantes -Soluciones -Medio de Murashige Skoog -Camara de radiación -Autoclave	-AAMIR ALI -HUMERA AFRASIAB -SHAGUFTA NAZ -MAMOONA RAUF -JAVED IQBAL	2008	https://www.researchgate.net/publication/216321465_An_Efficient_Protocol_for_In_vitro_Propagation_of_Carnation_Dianthus_caryophyllus
7	Micropropagación de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) con el empleo de Biobrás-16	-Explantes -Placas Petri -Papel filtro -Soluciones -Medio de Murashige y Skoog -Stereo-Microscopio -Biobrás-16	CASTILLA VALDÉS, Yanelis	2008	https://aprenderly.com/doc/2785764/micropropagaci%C3%B3n-de-clavel-espa%C3%B1ol--dianthus-caryophyllus...

8	In Vitro Propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus L.*)	-Explante -Medio de murashige y skoog -Soluciones	-José L. CASAS -Enrique OLMOS -Abel PIQUERAS	2010	https://www.researchgate.net/publication/321617037_Protocols_for_In_Vitro_Propagation_of_Ornamental_Plants

9	Organogénesis directa en medio líquido en clavel en un biorreactor de bajo costo	-Explante -Soluciones -Agar Agar -Frascos de compota con tapa magenta -Biorreactor de bajo costo -Mangueras	-MONROY ÁLVAREZ, Ingrid Elizabeth -FILGUEIRA DUARTE,Juan José	2010	https://www.researchgate.net/profile/Juan-Filguiera/publication/277269933_Organogenesis_directa_en_medio_liquido_en_clavel_en_un_bioreactor_de_bajo_costo/links/5a2547630f7e9b71dd0785a5/Organogenesis-directa-en-medio-liquido-en-clavel-en-un-bioreactor-

					de-bajo-costo.pdf
10	Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de plantas obtenidas por cultivo De meristemo	-Explante -Biobrass-16 -Medio de Murashige Skoog	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María Esther	2011	http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas44/2NOTAS_44_2.pdf

11	Desarrollo de sistemas para la propagación masiva del clavel (*Dianthus caryophillis* L.) y del ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) A través del cultivo de tejidos vegetales	-Explante -Soluciones -Microscopio -Frascos	PÉREZ REYES, Martha Evelia GUTIÉRREZ CAMPOS, Rafael PÉREZ MOLPHE, Eugenio LIZALDE VIRAMONTES, Hugo	2012	https://investigacion.uaa.mx/RevistalyC/archivo/revista8/Articulo%208.pdf
12	Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus* L.), micropropagadas con biobras-16	-Explante -Soluciones -Biobrass-16 -Cámara de electroforesis -Buffer de corrida -Soluciones	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María E. -LARA RODRIGUEZ, Regla M.	2013	http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v35n1/ctr10114.pdf

13	Conservación in vitro del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de sales minerales	-Explantes -Medio de murashige y skoogs -Cámara de crecimiento -Soluciones	-JIMENEZ MARIÑA, Liudmila -SILVA PUPO, Juan José -BORGES GARCIA, Misterbino -FONSECA ARIAS, Milvia	2015	https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212016000100177
14	Efecto de tres enraizantes en la propagación asexual de esquejes de clavel (Dianthus caryophyllus, L.) en condiciones de invernadero	-Explantes -Soluciones de enraizantes -Probetas -Calendario	NEYRA LOPEZ, Mary Rossana	2018	https://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/2868/TESIS-2018-AGRONOM%C3%8DA-NEYRA%20LOPEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y

15	Propagación y conservación in vitro de clavel (Dianthus ssp.)	-Explantes -Soluciones -Tubos de ensayo Frascos tipo botella	FONSECA CARRASCO, Yanexis BAHÍ AREVICH, Marisel SILVA PUPO, Juan José	2020	https://revistas.udg.co.cu/index.php/redel/article/view/1695/3040

16	Efectividad de dos métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*)	-Explantes -Placas Petri -Soluciones	CASTILLA VALDES, Yanelis GONZALES VEGA, Maria Esther	2007	https://www.researchgate.net/profile/Yanelis-Castilla/publication/282769573_Efectividad_de_dos_metodos_de_desinfeccion_en_el_establecimiento_in_vitro_de_semillas_de_clavel_espanol_Dianthus_caryophyllus_L/links/572a3a0508aef7c7e2c4f541/Efectividad-de-dos-metodos-de-desinfeccion

					-en-el-establecimiento-in-vitro-de-semillas-de-clavel-espanol-Dianthus-caryophyllus-L.pdf

Tabla N° 3, Tipos de materiales y equipos de desinfección utilizados en la propagación.

N°	TÍTULO	MATERIALES Y EQUIPOS DE DESINFECCIÓN	AUTOR	AÑO	LINK
1	Análisis comparativo de entre las diferentes metodologías de micropropagación de variedades de clavel (*Dianthus caryophillus L.*)	-Autoclave -Agua destilada -Detergente -Tween 80 -Cámara de flujo -Hipoclorito de sodio -	GUEVARA VALENCIA, Marina	2004	https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/47312/GuevaraValenciaMarina.pdf?sequence=1&isAllowed=y

2	Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus L.* “clavel”	-Etanol -Hipoclorito de sodio -Agua destilada -Cámara de flujo laminar	AFANADOR PEREZ, Ana María	2005	https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8740/tesis68%20%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y
3	Efecto de 6-bencylaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación in vitro de yemas de *Dianthus caryophyllus L.* “clavel”	-Solución de agua y jabón -Agua natural -Alcohol -Agua destilada -Hipoclorito de sodio	NORBERTO RODRÍGUEZ, Carlos PRETEL SEVILLANO, Orlando REYNA SÁNCHEZ, Wilson MERCADO PAREDES, Doris	2007	https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v04n2/pdf/a05v4n2.pdf
4	Comportamiento in vitro de tres variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y reducción de la fase de enraizamiento para la obtención de plantas madres	-Agua -Camara de flujo -Alcohol -Hipoclorito de sodio -Agua destilada estéril	QUISPE FLORES, Celia Roberta	2007	https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5102/T-1169.pdf?sequence=1&isAllowed=y

5	Efectividad de dos métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*)	-Cámara de flujo laminar -Hipoclorito de sodio -Agua destilada -Cloratamina-T	CASTILLA VALDES, Yanelis GONZALES VEGA, Maria Esther	2007	https://bit.ly/2R6MfUz
6	Un protocolo eficiente para la propagación in vitro de clavel (*Dianthus caryophyllus*)	-Agua de grifo -Detergente -Hipoclorito de sodio -Etanol -Agua destilada -Autoclave -Cámara de flujo laminar	-AAMIR ALI -HUMERA AFRASIAB -SHAGUFTA NAZ -MAMOONA RAUF -JAVED IQBAL	2008	https://www.researchgate.net/publication/216321465_An_Efficient_Protocol_for_In_vitro_Propagation_of_Carnation_Dianthus_caryophyllus

7	Micropropagación de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) con el empleo de Biobrás-16	-Hipoclorito de sodio -Cloramina-T -Cámara de flujo laminar -Agua destilada	CASTILLA VALDÉS, Yanelis	2008	https://aprenderly.com/doc/2785764/micropropagaci%C3%B3n-de-clavel-espa%C3%B1ol--dianthus-caryophyllus ...
8	In Vitro Propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus L.*)	-Etanol -Hipoclorito de sodio -Agua destilada -Tween-20	-José L. CASAS -Enrique OLMOS -Abel PIQUERAS	2010	https://www.researchgate.net/publication/321617037_Protocols_for_In_Vitro_Propagation_of_Ornamental_Plants

9	Organogénesis directa en medio líquido en clavel en un biorreactor de bajo costo	-Etanol -Hipoclorito de sodio -Agua destilada	-MONROY ÁLVAREZ, Ingrid Elizabeth -FILGUEIRA DUARTE,Juan José	2010	https://www.researchgate.net/profile/Juan-Filguiera/publication/277269933_Organogenesis_directa_en_medio_liquido_en_clavel_en_un_bioreactor_de_bajo_costo/links/5a2547630f7e9b71dd0785a5/Organogenesis-directa-en-medio-liquido-en-clavel-en-un-bioreactor-de-bajo-costo.pdf

10	Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de plantas obtenidas por cultivo De meristemo	No presenta proceso de desinfección	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María Esther	2011	http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas44/2NOTAS_44_2.pdf
11	Desarrollo de sistemas para la propagación masiva del clavel (*Dianthus caryophillis L.*) y del ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) A través del cultivo de tejidos vegetales	-Solución d agua con extran -Etanol -Cloralex -Agua estéril -Campana de flujo laminar	-PÉREZ REYES, Martha Evelia -GUTIÉRREZ CAMPOS, Rafael -PÉREZ MOLPHE, Eugenio -LIZALDE VIRAMONTES, Hugo	2012	https://investigacion.uaa.mx/RevistalyC/archivo/revista8/Articulo%208.pdf
12	Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*), micropropagadas con biobras-16	No presenta sistema de desinfección	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María E. -LARA RODRIGUEZ, Regla M.	2013	http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v35n1/ctr10114.pdf

13	Conservación in vitro del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de sales minerales	-Autoclave -Cabina de flujo laminar -Horno microondas	-JIMENEZ MARIÑA, Liudmila -SILVA PUPO, Juan José -BORGES GARCIA, Misterbino -FONSECA ARIAS, Milvia	2015	https://bit.ly/3fD5ZcF
14	Efecto de tres enraizantes en la propagación asexual de esquejes de clavel (Dianthus caryophyllus, L.) en condiciones de invernadero	-Hipoclorito de sodio -Agua destilada	NEYRA LOPEZ, Mary Rossana	2018	https://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/2868/TESIS-2018-AGRONOM%C3%8DA-NEYRA%20LOPEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y
15	Cultivo de meristemos en clavel (Dianthus caryophyllus)	No presenta proceso de desinfección.	-GUEVARA, Marina -BARNEY, Humberto -VILLEGAS, Telma	---	https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XII/CXII-37.pdf

Tabla N° 4. Métodos de microropagación in vitro.

N°	TÍTULO	MÉTODOS	AUTOR	AÑO	LINK
1	Análisis comparativo de entre las diferentes metodologías de micropropagación de variedades de clavel (*Dianthus caryophillus L.*)	Cultivo de meristemos; Organogénesis Embriogénesis	GUEVARA VALENCIA, Marina	2004	https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/47312/GuevaraValenciaMarina.pdf?sequence=1&isAllowed=y
2	Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus L.* “clavel”	Cultivo de meristemos	AFANADOR PEREZ, Ana María	2005	https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8740/tesis68%20%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y

3	Efecto de 6-bencylaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación in vitro de yemas de *Dianthus caryophyllus L.* “clavel”	Cultivo de meristemos	NORBERTO RODRÍGUEZ, Carlos PRETEL SEVILLANO, Orlando REYNA SÁNCHEZ, Wilson MERCADO PAREDES, Doris	2007	https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v04n2/pdf/a05v4n2.pdf
4	Comportamiento in vitro de tres variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y reducción de la fase de enraizamiento para la obtención de plantas madres	Cultivo de meristemos	QUISPE FLORES, Celia Roberta	2007	https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5102/T-1169.pdf?sequence=1&isAllowed=y
5	Efectividad de dos métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*)	Embriogénesis	CASTILLA VALDES, Yanelis GONZALES VEGA, Maria Esther	2007	https://bit.ly/2R6MfUz

6	Un protocolo eficiente para la propagación in vitro de clavel (*Dianthus caryophyllus*)	Cultivo de meristemos	-AAMIR ALI -HUMERA AFRASIAB -SHAGUFTA NAZ -MAMOONA RAUF -JAVED IQBAL	2008	https://www.researchgate.net/publication/216321465_An_Efficient_Protocol_for_In_vitro_Propagation_of_Carnation_Dianthus_caryophyllus
7	Micropropagación de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) con el empleo de Biobrás-16	Embriogénesis , Cultivo de meristemos	CASTILLA VALDÉS, Yanelis	2008	https://aprenderly.com/doc/2785764/micropropagaci%C3%B3n-de-clavel-espa%C3%B1ol--dianthus-caryophyllus ...
8	In Vitro Propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus L.*)	Cultivo de meristemos	-José L. CASAS -Enrique OLMOS -Abel PIQUERAS	2010	https://www.researchgate.net/publication/321617037_Protocols_for_In_Vitro_Propagation_of_Ornamental_Plants

9	Organogénesis directa en medio líquido en clavel en un biorreactor de bajo costo	Cultivo de meristemos	-MONROY ÁLVAREZ, Ingrid Elizabeth -FILGUEIRA DUARTE,Juan José	2 0 1 0	https://n9.cl/l8g4r
10	Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de plantas obtenidas por cultivo De meristemo	Organogénesis	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María Esther	2 0 1 1	http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas44/2NOTAS_44_2.pdf
11	Desarrollo de sistemas para la propagación masiva del clavel (*Dianthus caryophillis L.*) y del ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) A través del cultivo de tejidos vegetales	Cultivo de meristemos; Rescate de embriones	-PÉREZ REYES, Martha Evelia -GUTIÉRREZ CAMPOS, Rafael -PÉREZ MOLPHE, Eugenio -LIZALDE VIRAMONTES, Hugo	2 0 1 2	https://investigacion.uaa.mx/RevistalyC/archivo/revista8/Articulo%208.pdf

12	Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*), micropropagadas con biobras-16	Organogénesis	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María E. -LARA RODRIGUEZ, Regla M.	2013	http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v35n1/ctr10114.pdf
13	Conservación in vitro del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de sales minerales	Cultivo de tejidos	-JIMENEZ MARIÑA, Liudmila -SILVA PUPO, Juan José -BORGES GARCIA, Misterbino -FONSECA ARIAS, Milvia	2015	https://bit.ly/3fD5ZcF
14	Efecto de tres enraizantes en la propagación asexual de esquejes de clavel (Dianthus caryophyllus, L.) en condiciones de invernadero	Organogénesis	NEYRA LOPEZ, Mary Rossana	2018	https://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/2868/TESIS-2018-AGRONOM%C3%8DA-NEYRA%20LOPEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y

15	Cultivo de meristemos en clavel (Dianthus caryophyllus)	Cultivo de tejidos	-GUEVARA, Marina -BARNEY, Humberto -VILLEGAS, Telma	----	https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XII/CXII-37.pdf

Tabla N° 5, Medios de cultivo utilizados en la micropropagación de clavel (*Dianthus caryophillus*.

N°	TÍTULO	MEDIOS DE CULTIVO	AUTOR	AÑO	LINK
1	Análisis comparativo de entre las diferentes metodologías de micropropagación de variedades de clavel (*Dianthus caryophillus L.*)	-Murashige y Skoog -Gamborg	GUEVARA VALENCIA, Marina	2004	https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/47312/GuevaraValenciaMarina.pdf?sequence=1&isAllowed=y
2	Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus L.* “clavel”	Murashige y Skoog	AFANADOR PEREZ, Ana María	2005	https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8740/tesis68%20%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y

3	Efecto de 6-bencylaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación in vitro de yemas de *Dianthus caryophyllus L.* “clavel”	Murashige y Skoog	NORBERTO RODRÍGUEZ, Carlos PRETEL SEVILLANO, Orlando REYNA SÁNCHEZ, Wilson MERCADO PAREDES, Doris	2007	https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v04n2/pdf/a05v4n2.pdf
4	Comportamiento in vitro de tres variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y reducción de la fase de enraizamiento para la obtención de plantas madres	Murashige y Skoog	QUISPE FLORES, Celia Roberta	2007	https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/5102/T-1169.pdf?sequence=1&isAllowed=y
5	Efectividad de dos métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*)	Murashige y Skoog	CASTILLA VALDES, Yanelis GONZALES VEGA, Maria Esther	2007	https://bit.ly/2R6MfUz

6	Un protocolo eficiente para la propagación in vitro de clavel (*Dianthus caryophyllus*)	Mureashige y Skoog	-AAMIR ALI -HUMERA AFRASIAB -SHAGUFTA NAZ -MAMOONA RAUF -JAVED IQBAL	2008	https://www.researchgate.net/publication/216321465_An_Efficient_Protocol_for_In_vitro_Propagation_of_Carnation_Dianthus_caryophyllus
7	Micropropagación de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) con el empleo de Biobrás-16	Murashige y Skoog	CASTILLA VALDÉS, Yanelis	2008	https://aprenderly.com/doc/2785764/micropropagaci%C3%B3n-de-clavel-espa%C3%B1ol--dianthus-caryophyllus ...
8	In Vitro Propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus L.*)	Murashige y Skoog	-José L. CASAS -Enrique OLMOS -Abel PIQUERAS	2010	https://www.researchgate.net/publication/321617037_Protocols_for_In_Vitro_Propagation_of_Ornamental_Plants

9	Organogénesis directa en medio líquido en clavel en un biorreactor de bajo costo	Murashige y Skoog	-MONROY ÁLVAREZ, Ingrid Elizabeth -FILGUEIRA DUARTE,Juan José	2010	https://n9.cl/l8g4r
10	Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la propagación por esquejes de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de plantas obtenidas por cultivo De meristemo	Murashige y Skoog Biobrás-16	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María Esther	2011	http://www.utm.mx/edi_anteriores/temas44/2NOTAS_44_2.pdf
11	Desarrollo de sistemas para la propagación masiva del clavel (*Dianthus caryophillis L.*) y del ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) A través del cultivo de tejidos vegetales	Murashige Skoog	-PÉREZ REYES, Martha Evelia -GUTIÉRREZ CAMPOS, Rafael -PÉREZ MOLPHE, Eugenio -LIZALDE VIRAMONTES, Hugo	2012	https://investigacion.uaa.mx/RevistalyC/archivo/revista8/Articulo%208.pdf

12	Determinación de estabilidad genética en vitroplantas de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.),* micropropagadas con biobras-16	Murashige y Skoog	-CASTILLA VALDÉS, Yanelis -GONZALES VEGA, María E. -LARA RODRIGUEZ, Regla M.	2013	http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v35n1/ctr10114.pdf
13	Conservación in vitro del cultivo de clavel español (*Dianthus caryophyllus L.*) a partir de sales minerales	Murashige y Skoog	-JIMENEZ MARIÑA, Liudmila -SILVA PUPO, Juan José -BORGES GARCIA, Misterbino -FONSECA ARIAS, Milvia	2015	https://bit.ly/3fD5ZcF
14	Efecto de tres enraizantes en la propagación asexual de esquejes de clavel (Dianthus caryophyllus, L.) en condiciones de invernadero	-Auxinas -Giberelinas -Citoquininas	NEYRA LOPEZ, Mary Rossana	2018	https://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/2868/TESIS-2018-AGRONOM%C3%8DA-NEYRA%20LOPEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y

15	Cultivo de meristemos en clavel (Dianthus caryophyllus)	-Ácido-indol-acético -Cinetina -Ácido giberélico	-GUEVARA, Marina -BARNEY, Humberto -VILLEGAS, Telma	---	https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XII/CXII-37.pdf

La aplicación de técnicas de cultivo in vitro de tejidos en ornamentales es una alternativa que permite suministrar al floricultor material vegetal revigorizado (rejuvenecimiento) y con condiciones fitosanitarias adecuadas para enraizamiento y producción de esquejes para multiplicación masiva. Teniendo en cuenta la importancia económica del clavel, la empresa privada se ha interesado en utilizar ésta herramienta, que ofrece alternativas respecto a la calidad del material vegetal. Sin embargo, se conoce poco del comportamiento in vitro de las variedades comerciales cultivadas en condiciones nacionales, razón por la cual es primordial la intervención del ámbito académico, con el fin de investigar, conocer, y ofrecer alternativas que apoyen los sistemas de propagación convencional.

Sin embargo, es conocido que además de los beneficios que se obtienen con la aplicación de la propagación in vitro y el uso de nuevos biorreguladores en los medios de cultivo, estos pueden introducir alteraciones en el material hereditario, como micro lesiones y macro lesiones, por lo que un requerimiento importante para que el proceso de regeneración in vitro sea exitoso es que las plantas regeneradas presenten estabilidad genética, comparadas con las plantas propagadas convencionalmente. La electroforesis de isoenzimas, como un

estudio directo del producto de los genes, permite la observación de cambios somáticos, ya que la pérdida o aparición de bandas isoenzimáticas puede indicar la presencia de mutaciones debidas a la recombinación mitótica, de lesiones, duplicaciones, cambios de bases o eventos de transposición. Estos estudios, entre otros, permiten detectar algunas de estas alteraciones, además de que la metodología empleada para su análisis es rápida, sencilla y económica con respecto a las diversas técnicas empleadas.

4.1. Ventajas

- La multiplicación in vitro es masiva y más rápida.
- A veces es posible propagar especies in vitro, que no pueden ser multiplicadas en forma tradicional; esto es posible al fenómeno de rejuvenecimiento, que sólo es posible realizarlo in vitro.
- El crecimiento de las plantas propagadas in vitro es frecuentemente más vigoroso que el de las clonadas in vivo; esto se debe sobre todo al rejuvenecimiento y / o al hecho de que las plantas in vitro se encuentran libres de enfermedades.
- Utilizando el cultivo in vitro es posible, conseguir una multiplicación libre de enfermedades, bien por una rigurosa selección del material inicial, o bien liberando el material inicial de enfermedades.
- Homogeneidad del material.
- Multiplicación todo el año. Porque se trabaja en condiciones ambientales controladas.
- Ya que se necesita una cantidad de material relativamente pequeña para iniciar un cultivo in vitro, se puede realizar una cuidadosa selección del mismo.

- Ahorro de espacio con respecto de los sistemas tradicionales.
- Conservación del material genético.
- Fácil transporte intercambio de material vegetal.

4.2. Desventajas

- En algunos sistemas de propagación in vitro la estabilidad genética es débil.
- Las plantas producidas in vitro pueden mostrar características poco convenientes in vivo: Excesiva producción de ramas laterales y paso total a la fase juvenil.
- La aclimatación de las plántulas es un proceso difícil y puede que muchas veces, los mayores porcentajes de la pérdida se presenten en esa etapa.
- Difícil respuesta inicial de algunas especies y genotipos.
- Variación de respuesta entre los genotipos.
- Alto costo de establecimiento de un laboratorio, lo que incide indirectamente en el precio final de la planta producido de esta manera.
- Necesidad de una mano de obra especializada.

4.3. PROCESOS DE DESINFECCIÓN UTILIZADOS EN LOS DISTINTOS TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN PARA MICROPROPAGACIÓN DE CLAVEL (DIANTHUS CARYOPHYLLUS)

4.3.1. Efecto de tres enraizantes en la propagación asexual de esquejes de clavel (*Dianthus caryophyllus, L.*) en condiciones de invernadero (Tabla 3, Anexo 1).

Las semillas se sumergieron en un recipiente que contenida 100 ml agua destilada con un 1% de detergente y se le adicionaron 2 o 3 gotas de Tween 80. Después de agitarlas vigorosamente durante cinco minutos, se enjuagaron 4 veces con 100 ml agua destilada para eliminar los residuos de detergente existentes.

Posteriormente, en la cámara de flujo laminar (CFL), Marca VECO, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO, 6% de cloro libre), analizándose 6 tratamientos con 3 concentraciones de hipoclorito de sodio y 2 tiempos de exposición de las semillas; finalizando con 3 lavados con 100 ml de agua destilada estéril para eliminar todo residuo de detergente.

4.3.2. Propagación in vitro a partir de meristemos de cinco variedades comerciales de Dianthus caryophyllus L. "clavel" (Tabla 1, Anexo 2).

Los esquejes se colocaron en recipientes estériles, manteniéndose en constante agitación con diferentes sustancias (Etanol al 50 % durante 30 segundos, solución de Hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 3 minutos. Cuatro lavados con agua destilada, desionizada estéril, en cámara de flujo laminar.

4.3.4. Efecto de 6-bencylaminopurina y ácido indolacético en la micropropagación in vitro de yemas de Dianthus caryophyllus L. "clavel" (Tabla 3, Anexo 3)

Se desinfectó los segmentos de tallo que contienen las yemas con un lavado con agua jabonosa, se las enjuaga con agua corriente, luego se les lavó con alcohol al 70%, por un minuto al término del cual se les enjuagó con agua destilada estéril, luego se procedió a lavarlos con hipoclorito de sodio al 2.5% por un tiempo de 10 minutos, en constante agitación lenta, se procedió luego a enjuagar por tres veces para eliminar todo el hipoclorito de sodio. Con un bisturí y pinzas debidamente esterilizadas se procedió a retirar las yemas, de inmediato fueron transferidas a los frascos conteniendo el medio de iniciación debidamente esterilizado, se les tapó con papel aluminio. Todo este proceso se realizó en un ambiente (cámara) debidamente esterilizada con luz UV por espacio de 12 horas.

4.3.5. Comportamiento in vitro de tres variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y reducción de la fase de enraizamiento para la obtención de plantas madres (Tabla 3, Anexo 4).

El material vegetal fue previamente lavado con agua, para eliminar cualquier tipo de suciedad; posteriormente se procedió a dividirlo en tres partes iguales (superior, medio y basal), cada parte con dos nudos y cada nudo con una yema, luego se procedió a retirar las hojas que cubren las yemas.

Seguidamente fueron llevadas a la cámara de flujo laminar de aire donde se esterilizaron dentro un vaso por inmersión, en una solución de alcohol al 70 % durante 30 segundos agitándose varias veces. A continuación, sumergido durante 10 minutos en hipoclorito de sodio al 3% y posteriormente se hizo cuatro enjuagues con agua destilada estéril, cada vez por 3 minutos.

4.3.6. Efectividad de dos métodos de desinfección en el establecimiento in vitro de semillas de clavel español (*Dianthus caryophyllus*), (Tabla 3, Anexo 5)

- Desinfección con lejía

Inmediatamente después de la apertura del sobre que contiene las semillas de claveles españoles, estas fueron trasladadas al cuarto de siembra y en el flujo laminar se sumergieron en una solución de lejía (NaOCl, 6 % de cloro activo) al 5 % durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una placa Petri con papel de filtro humedecido para facilitar su manipulación y siembra.

- Desinfección con cloramina-T

Igualmente se trasladaron las semillas al cuarto de siembra y en el flujo laminar se sumergieron en una solución de cloramina-T al 1% durante 20 minutos. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una placa Petri con papel de filtro humedecido para facilitar su manipulación y siembra.

4.3.7. Un protocolo eficiente para la propagación in vitro de clavel (*Dianthus caryophyllus*) (Tabla 3, Anexo 6).

Se lavaron a fondo con agua del grifo y luego con detergente doméstico para eliminar todos los rastros de partículas de polvo. Los explantes luego se sumergen en una solución acuosa al 7,5% de hipoclorito de sodio durante 15 minutos y se enjuagó a fondo. de La solución de hipoclorito sodio se decantó y los brotes apicales se enjuagaron tres veces con autoclave y agua destilada para eliminar los demás agentes que no fueron esterilizados. También, se limpió con solución de etanol al 70% y se irradió con irradiaciones UV durante 25 minutos antes de su uso. Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 ° C por 15 minutos a 15 libras / pulgada2 presión.

4.3.8. Micropropagación de clavel español (Dianthus caryophyllus L.) con el empleo de Biobrás-16 (Tabla 3, Anexo 7).

- Tratamiento con hipoclorito de sodio

Las semillas de clavel español fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl, 6 % de cloro activo) al 5 % durante 15 minutos. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una placa Petri con papel de filtro humedecido para facilitar su manipulación y siembra.

- Tratamiento con cloramina-T

Las semillas se sumergieron en una solución de cloramina-T al 1 % durante 20 minutos. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en una placa Petri con papel de filtro humedecido.

4.3.9. In Vitro Propagation of Carnation (Dianthus caryophyllus L.) (Tabla 3, Anexo 8)

Se enjuagó los segmentos nodales tres veces en etanol al 70%, luego esterilizaron la muestra entre 8 a 10 min en hipoclorito de sodio al 2% que contiene 0.01% Tween-20, y enjuague veces tres en agua destilada estéril.

4.3.10. Organogénesis directa en medio líquido en clavel en un biorreactor de bajo costo (Tabla 3, Anexo 9).

Para la propagación del material vegetal en condiciones in Vitro y la evaluación de los ensayos, el material ex Vitro se desinfecto con etano al 70% un minuto, hipoclorito de sodio 5% un minuto y dos lavados con agua destilada estéril.

4.3.11. Desarrollo de sistemas para la propagación masiva del clavel (*Dianthus caryophillis L.*) y del ave del paraíso (*Strelitzia reginae*) A través del cultivo de tejidos vegetales (Tabla 3, Anexo 11).

Se enjuaga con una solución de agua más extran, luego se desinfectó en etanol al 70% por 30 segundos, en seguida se coloca en cloralex al 10% por 15 minutos, así mismo, se enjuaga con agua estéril en la campana de flujo laminar.

4.3.12. Conservación in vitro del cultivo de clavel español (Dianthus caryophyllus L.) a partir de sales minerales (Tabla 3, Anexo 13)

El medio de cultivo se fundió durante diez minutos en horno microondas, se enfrió hasta 50 °C y luego se distribuyó en tubos de ensayos de 24 x 150 mm, a razón de 15 ml por tubo. Finalmente, se esterilizó en autoclave durante 25 min a 1,2 kg/cm² atmósfera de presión y 121 ºC de temperatura. Los medios se mantuvieron tres días, como mínimo, antes de su uso para descartar cualquier contaminación de los mismos. Los experimentos de laboratorio se desarrollaron bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar.

4.3.13. Efecto de tres enraizantes en la propagación asexual de esquejes de clavel (Dianthus caryophyllus, L.) en condiciones de invernadero (Tabla 3, Anexo 14).

Se desinfecto los esquejes de clavel con lejía al 5% por un periodo de 5 minutos, Luego se enjuagó con agua destilada.

Para la realización del presente trabajo se utilizó el medio de cultivo propuesto por Murashige, (1962); en la organogénesis en el cultivo de meristemos, el cultivo de yemas axilares y apicales además también se utilizó para el desarrollo de brotes en la etapa final del proceso de embriogénesis.

4.4. MEDIOS DE CULTIVO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.4.1. TABLA 5, ANEXO 1

Tabla N°2. Composición del Medio Murashige y Skoog (1962).

	Consituyente	$mg.L^{-1}$
Macroelementos	$CaCl_2 . 2 H_2O$	440.0
	KNO_3	1900.0
	KH_2PO_4	170.0
	NH_4NO_3	1650.0
	$FeSO_4 . 7 H_2O$	27.8
	$MgSO_4 . 7 H_2O$	37.3
Microelementos	$CoCl_2 . 6 H_2O$	0.025
	$CuSO_4 . 5 H_2O$	0.025
	H_3BO_3	5.2
	KI	0.83
	$MnSO_4 . 4 H_2O$	22.3
	$Na_2MoO_4 . 2 H_2O$	0.25
	$ZnO_4 . 7 H_2O$	8.6
Suplementos	Ácido nicotínico	0.5
	Piridoxina.HCl	0.5
	Tiamina	0.1
	Glicina	2.0
	Inositol	100

El medio MS se complementó con 25 g de sacarosa, 8 g de agar y el pH se ajustó a 5.7.

Para la inducción del callo embriogénico, la suspensión celular y la conversión de embrión somático, se empleó una modificación del medio de Gamborg (1968). La tabla 3, indica la composición del medio Gamborg (B5) y las modificaciones realizadas (B5H).

Tabla N°3, Composición del medio B5 y B5H

	Constituyente	B_5 $(mg.L^{-1})$	B_5H $(mg.L^{-1})$
B_5 Mayor	$NaH_2PO_4 . H_2O$	150	150
	KNO_3	2500	2528
	$MgSO_4 . 7 H_2O$	250	500
	$(NH_4)_2$ citrato dibásico	-	2827
	$(NH_4)_2SO_4$	134	-
B_5 Menor	$CaCl_2 . 2 H_2O$	150	-
	$FeSO_4 . 7 H_2O$	27.8	
	$CoCl_2 . 6 H_2O$	0.025	0.025
	$CuSO_4 . 5 H_2O$	0.025	0.025
	H_3BO_3	3.0	3
	KI	0.75	0.75
	$MnSO_4 . H_2O$	10.0	10
	$Na_2MoO_4 . 2 H_2O$	0.25	0.25
	$ZnSO_4 . 7 H_2O$	2.0	2
B_5 Vitaminas	Acido nicotinico	1.0	1
	Piridoxina.HCl	1.0	1
	Tiamina.HCl	10	10
	Inositol	100	100
	FeEDTA (*)	-	10 ml
	$Na_2EDTA. 2 H_2O$	37.3	-
	$CaCl_2$ (**)	-	22.6 ml
B_5 Compuestos orgánicos	Sacarosa	20 g	30 g
	Caseina ácida hidrolizada	-	1.75 g

FeEDTA (*)	$FeSO_4. 7 H_2O$	280 mg/100 ml
	Na_2EDTA	375 mg/100 ml

$CaCl_2$ (**)	$CaCl_2$	3.22 mg/100 ml

El medio B5H se complementó con 30 g de sacarosa y el pH se ajustó a 5.5, en el caso de inducción de callo embriogénico y conversión del embrión somático se utilizaron 8 g/L de agar.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS REALIZADOS

a) Análisis estadístico para los métodos de desinfección

Se ensayaron las 6 variedades de semilla con los 6 tratamientos, con 50 repeticiones, con un total de 1 800 muestras experimentales. Se evaluó el efecto del tratamiento.

Cuadro N° 1. Tratamientos evaluados para la desinfección de semillas de clavel (Dianthus caryophyllus L.)

Tratamientos	NaClO (%)	Tiempo (min)	Semillas sembradas
A	2.5	10	50
B	2.5	15	50
C	3.0	10	50
D	3.0	15	50
E	3.5	10	50
F	3.5	15	50

Las observaciones se realizaron a las 72 horas después de realizado el cultivo y se evalúa el tratamiento con número mayor de explantes libre de contaminación. El diseño experimental empleado fue completamente al azar y se realizó un análisis de varianza factorial.

Tabla N° 4. *Análisis de Varianza Factorial para los Tratamientos de desinfección de semillas de Clavel (Dianthus caryophyllus L.).*

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Variedad	5	10.6494	2.1298	36.16	0.0001
Concentración	2	0.0844	0.0422	0.72	0.4887
Tiempo	1	0.6805	0.6805	11.55	0.0007
Variedad*Concentración	10	0.5155	0.0515	0.87	0.5565
Variedad*Tiempo	5	0.2094	0.0418	0.71	0.6154
Variedad*concentración*tiempo	12	1.9200	0.1600	2.71	0.0012

El comportamiento de las variedades de semillas de clavel *Dianthus caryophyllus L.* ante los tratamientos de desinfección, presentaron diferencias significativas, en el gráfico 1, se expresa el análisis de comparación de medias de Tukey.

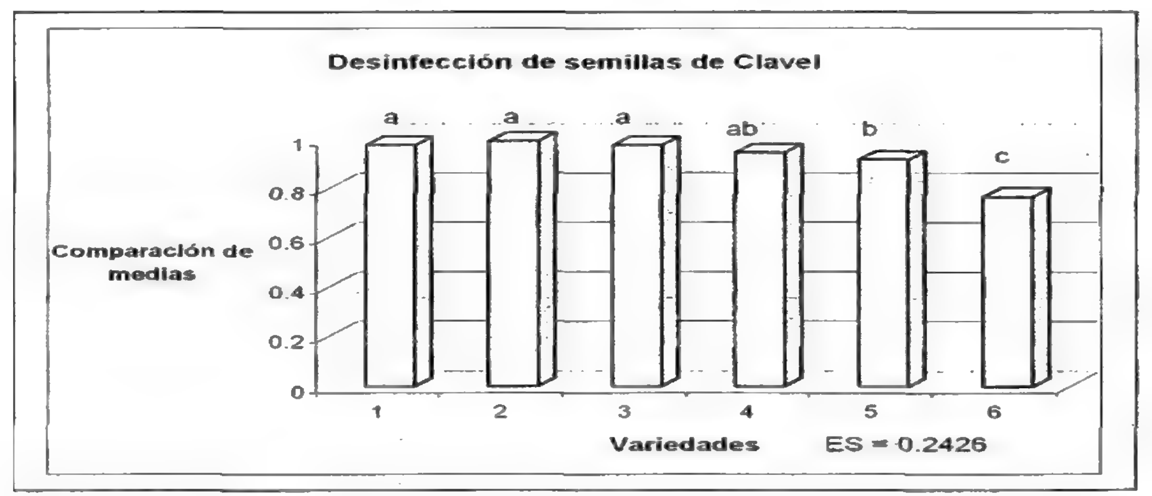


GRAFICO N° 1. Desinfección de las variedades de clavel (Dianthus caryophyllus)

Podemos apreciar que las variedades 1, 2 y 3 (Fito, Vita y Batlle, S.A.); no presentan diferencia estadísticamente significativa, ante los tratamientos de desinfección propuestos, esto se atribuye a que se trata de productos de importación empacados al alto vacío lo que asegura que se encuentran libres de contaminación; la variedad 3, (Happy Flower Mexicana, S.A.), de origen mexicano es de buena calidad, pero no está empacado al alto vacío, lo que representan una desventaja en comparación con las 3 primeras variedades; la variedad 4 (Lone Star Seed Co.), es un producto de importación, empacada en forma sencilla y a través de su manejo puede sufrir alteraciones, finalmente la variedad 6, es un tipo de semillas que al manejarse a granel la hace estar expuesta a todo tipo de contaminación. El factor tiempo también presenta diferencias significativas, obteniéndose los mejores resultados en un tiempo de exposición de 10 min. La interacción variedad-concentración-tiempo, resulta con diferencias estadísticamente significativas tal como se observa en el cuadro 23, donde se aprecia que los mayores niveles de desinfección se obtienen con exposiciones de 10 min. Las variedades 1, 2 3, 4 y 5 presentan un

comportamiento muy semejante al utilizar el tratamiento con 2.5 % de NaClO; incluso la variedad 6 que presenta un comportamiento irregular durante la experimentación, logra el mayor nivel de desinfección de los tratamientos ensayados. Estos resultados permiten señalar al tratamiento A (2.5 % de NaClO y 10 min. de exposición), como el más adecuado para realizar la desinfección de las diferentes variedades de semillas de clavel *Dianthus caryophyllus L.*, durante este protocolo experimental. Este resultado cubre el objetivo planteado de encontrar una concentración baja que combinada con el factor tiempo ofreciera buenos resultados. Esta etapa de trabajo es decisiva porque a partir de ella se realizaron los siguientes ensayos. El análisis estadístico indica que las concentraciones ensayadas en forma aislada no presentan diferencias significativas, lo que se atribuye al pequeño rango entre las concentraciones planteadas. Las interacciones evaluadas entre variedad-concentración, y variedad- tiempo no resultaron con diferencias estadísticas significativas. Los resultados anteriores resultan más favorables comparados con los obtenidos por Montes (1997) quien ensayo 4 tratamientos con concentraciones desde 2 a 4 % por 15 min. de exposición; Zuker (1995) obtuvo resultados comparables pero utilizo un tratamiento previo con etanol al 70 % y posteriormente una solución de NaClO 1.25 % durante 8 minutos.; en igual forma lo plantean Nugent (1991) utilizando solución de NaClO 0.5 % por 15 min de exposición; Nakano (1992) con una solución de NaClO 1% por 10 min de exposición; Ozgen (1998), que refiere el uso de clorox comercial por 30 min; Sahoo (1998) señala utilizar solución de NaClO al 7 % en un intervalo de 7 a 10 min de exposición; Sankhla (1994) indican el uso de solución de NaClO 5.25 % por 15 min; Bespalhol (1998) refiere utilizar una solución de NaClO al 0.2 % pero en KH2P04 0.1M adicionada

con 0.1 % _de Tween 20 por 20 min; Chee (1990) indica el uso del clorox comercial al 2.5 % por 25 min y Frey (1991) utilizan una solución de NaClO al 0.5 % adicionada con Tween 20 por 30 min. El tratamiento A, con una concentración de 2.5 % de NaClO y 10 minutos de exposición es capaz desinfectar un 100 % de los explantes tratados, de 3 de las variedades, este resultado es fundamental en el establecimiento del cultivo aséptico.

Tabla N°5. Resultados de los tratamientos de desinfección (Prueba de Tukey).

Variedad*Concentración*Tiempo	Medias	Agrupamiento Tukey
1-2.5-10	1,0000	a
1-3.0-10	1.0000	a
1-3.5-10	1,0000	a
1-2.5-15	0.9400	a, b
1-3.0-15	0,9600	a, b
1-3.5-15	0.9600	a, b
2-2.5-10	1,0000	a
2-3.0-10	1.0000	a
2-3.5-10	1.0000	a
2-2,5-15	0.9600	a, b
2-3,0-15	1.0000	a
2-3.5-15	1.0000	a
3-2.5-10	1.0000	a
3-3.0-10	1.0000	a
3-3.5-10	0.9800	a, b
3-2.5-15	0.9400	a, b
3-3.0-15	0.9600	a, b
3-3.5-15	0.9800	a, b
4-2.5-10	1.0000	a
4-3.0-10	0.9600	a, b
4-3.5-10	0.9400	a, b
4-2.5-15	0.9000	a, b, c
4-3.0-15	0.9400	a, b
4-3.5-15	0.9400	a, b
5-2.5-10	0.9600	a, b
5-3,0-10	0.9000	a, b, c
5-3,5-10	0.9000	a, b, c
5-2,5-15	0.9000	a, b, c
5-3.0-15	0.9400	a, b
5-3.5-15	0.8800	a, b, c
6-2.5-10	0.9000	a, b, c
6-3.0-10	0.6800	d, e
6-3.5-10	0.8400	a, b, c, d
6-2,5-15	0.7400	d, e, c
6-3.0-15	0.8000	b, c, d, e
6-3,5-15	0,6400	e

alfa = 0,0100 MS = 125.28 df = 335.0

Medias con la misma letra no presentan diferenda significativa

b) Cultivo de semillas

Se prepararon frascos de 50 X 100 mm con 15 ml de medio MS (Murashige y Skoog, 1962), En una distribución completamente al azar, se sembraron cinco semillas equidistantes en cada frasco y 10 réplicas por tratamiento para cada una de las variedades. Los recipientes fueron sellados con papel aluminio.

Con el objetivo de determinar cuál es la variedad con mejor capacidad de germinación, se considera a los 30 días de cultivo el número de semillas germinadas por tratamiento; las siguientes variables, nos permitirán conocer a la variedad más vigorosa y con mejor capacidad para la micropropagación, por el número de explantes que proporciona, además se evaluó: altura en cm. y pares de hojas de las plantas germinadas. El diseño experimental empleado fue completamente al azar con un análisis de varianza de clasificación simple con una prueba de comparación de medias de Tuckey ($p<0.05$).

con el objeto de, determinar la variedad más eficiente con capacidad de germinación libre de contaminación, el cuadro contiguo indica que existen diferencias significativas, lo que se aprecia en el gráfico 2, donde se observa la presencia de dos grupos con diferencias estadísticamente significativas, en la capacidad de germinación; este comportamiento se atribuye al origen de las variedades ya comentado.

Tabla N°6. Cultivo de Semillas de Clavel (Dianthus caryophyllus L.)

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamientos	5	358.9666	71.7933	76.92	0.0001
Error	24	22.4000	0.9333		
Total	29	381.3666			

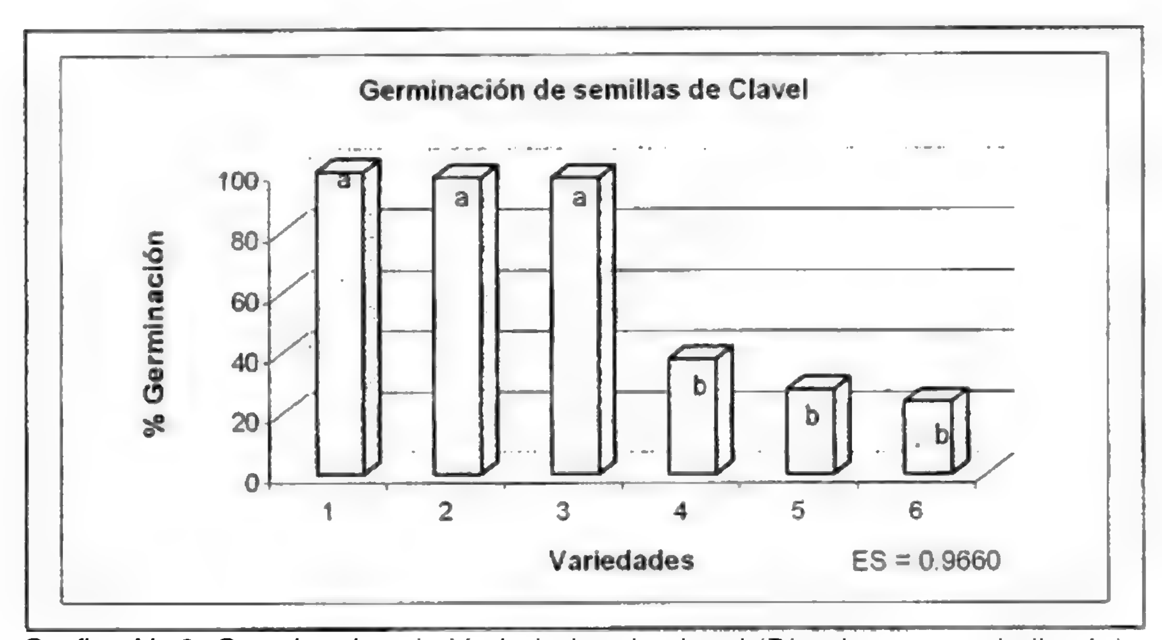


Grafico N°2. Germinacion de Variedades de clavel (Dianthus caryophyllus L.)

Se establece el cultivo aséptico al obtenerse un 100 % de eficiencia de germinación en 3 de las variedades. El resultado obtenido indica que para ensayos posteriores se contara capacidad de respuesta. También se evalúan variables cualitativas como: desarrollo de plántulas vigorosas, de buena talla y de color verde; y por tratarse de producto de importación, aquella que se pudiera conseguir con facilidad en el mercado nacional.

c) Cultivo de meristemos

Se indujo en el medio de cultivo MS complementado con las combinaciones de reguladores de crecimiento. Se ensayaron las 6 variedades por los 12 tratamientos con 10 repeticiones, con un total de 720 muestras; a los 30 días de establecido el cultivo se evaluó el tratamiento de mayor capacidad con regeneración de plántulas vigorosas, considerando las siguientes variables: número de meristemos convertidos en plántula, altura (cm), numero de pares de hojas y de plantas enraizadas. El diseño experimental empleado fue completamente al azar con un análisis de varianza de clasificación simple con una prueba de comparación de medias de Tuckey ($p<0.05$).

Tabla N° 7, Combinaciones de reguladores de crecimiento propuesta para el cultivo de meristemos.

Reg. de crecimiento ($mg.L^{-1}$)	Tratamientos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AIA 1.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CINETINA	0.5	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.5	1.5	1.5
AG_3	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5

para determinar el tratamiento con mayor capacidad de regeneracion de plantulas. Se aplico un analisis de varianza factorial 12 * 6 para establecer la interaction entre los tratamientos y las variedades; los resultados obtenidos se indican en el cuadro 25, en donde se observa que los tratamientos y las variedades presentan diferencias significativas, no asi la interaction entre ellos por lo que se precede a realizar una prueba de comparacidn de medias de Tukey ($p<0.05$).

Tabla N°8. análisis de varianza factorial para el cultivo de meristemos.

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamientos	11	18.1794	1.6526	7.29	0.0001
Variedades	5	12.9289	2.5857	11.41	0.0001
Tratamientos*Variedadades	55	11.2518	0.2045	0.90	0.6738
Error	648	146.8272	0.5966		
Total	719	189.1875	0.2265		

Tabla N° 9. Evaluación de los tratamientos ensayados en el cultivo de meristemos.

Agrupamiento Tukey	Medias	N	Tratamiento
a	0.7213	60	5
a	0.5833	60	7
a	0.5333	60	9
a	0.5333	60	8
a	0.5333	60	6
a	0.4915	60	4
a	0.4666	60	10
ab	0.4000	60	11
ab	0.3166	60	12
ab	0.3166	60	3
bc	0.1833	60	2
bc	0.1666	60	1

alfa = 0.05 df = 648 MSE = 0.2265

Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa

El análisis de las variedades, señala que el grupo formado por las variedades 2 y 3 no presenta diferencias significativas, estas variedades iniciaron cambios histológicos en los primeros 5 días de cultivo con una activa división celular en la superficie, después de 8 días los primordios fueron claramente visibles y después de 11 días el crecimiento de los brotes era evidente, hasta culminar en el desarrollo de plantulas sanas y vigorosas; en forma muy semejante expresa sus observaciones Altvorst, (1992); Miller, (1991); Ghosh, (1986). Las variedades 1 y 4, no presentan diferencias significativas, los valores de las medias son semejantes a los que presentan las variedades 2 y 3; los cambios histológicos observados se presentaron después de los 7 días de cultivo. Finalmente, los

tratamientos 5 y 6 con diferencias significativas entre ellos y con respecto a las variedades ensayadas; presentan el valor de la media más bajo del estudio, los cambios histológicos se presentaron después de 10 días, que los pone en notaria desventaja con el primer grupo, además de desarrollar plántulas de apariencia frágil, con tallos muy finos y hojas delgadas y muy espaciadas. Estos resultados no permiten un resultado concreto por lo que será necesaria la evaluación de los factores cuantitativos ya señalados con anterioridad.

Tabla N° 10. Evaluacion de las variedades ensayadas en el cuitivo de meristemos.

Agrupamiento Tukey	Medias	N	Variedades
a	0.5750	120	3
a	0.5500	120	2
a, b	0.5166	120	1
a, b	0.4333	120	4
b	0.3666	120	5
c	0.1833	120	6

alfa = 0.05 df = 648 MSE = 0.2265 DMS = 0.1756

Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa.

En este experimento se evaluaron variables cuantitativas como son: altura (cm.), numero de par de hojas desarrolladas, y plántulas con desarrollo de raíz; con el propósito de conocer el tratamiento y la variedad con capacidad de regenerar plántulas más vigorosas y con mayor posibilidad de adaptación a condiciones de invernadero en experimentos posteriores; por lo que se aplicó un análisis de varianza factorial 12*6 para establecer la interacción entre los tratamientos y las variedades con una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$).

*Tabla N° 11. Análisis de varianza factorial 12*6 para la variable altura de plántulas obtenidas en el cultivo de meristemos.*

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamiento	11	720.9041	65.5367	24.68	0.0001
Variedad	5	260.5182	52.1036	19.62	0.0001
Tratamiento*variedad	55	182.6033	3.3200	1.25	0.1121
Error	648	1720.5940	2.6552		
Total	719	2884.6197			

La prueba de comparación de medias, señala que el tratamiento 5, presenta diferencia significativa en relación con los demás tratamientos, además de tener la media más alta obtenida; los tratamientos 6 y 7 con valores de media más cercanos al del tratamiento 5, no presentan diferencia significativa entre ellos. Los tratamientos 8 al 12 forman un agrupamiento que decrece en el valor de la media y entre ellos no existen diferencias significativas, finalmente los tratamientos 1 y 2 con los valores de media más bajo obtenidos no presentan diferencia significativa. Este resultado es una evidencia más de la capacidad del tratamiento 5, donde las plántulas forman brotes vigorosos de color verde, con tallos rectos y firmes.

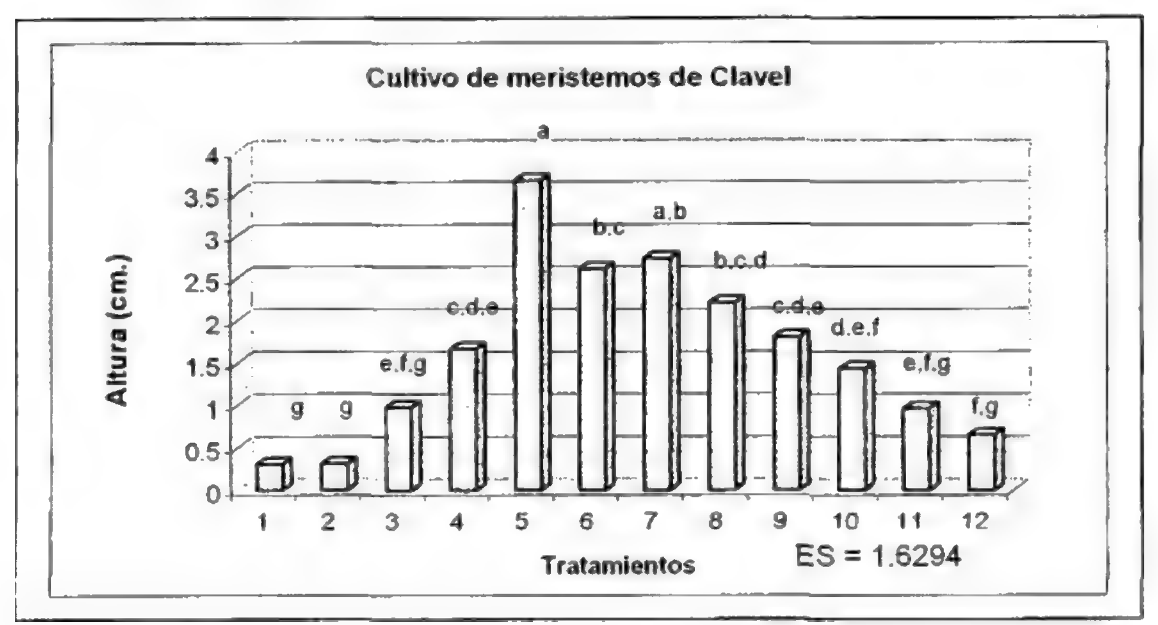


Gráfico N°3. Determinación de altura.

El cuadro 12, indica los resultados de altura de las variedades de clavel (*Dianthus caryophyllus L.*), de acuerdo a los tratamientos para el cultivo de meristemos ensayados; como se observa la variedad 3, (semillas Battle, S. A.) con la media de respuesta más alta, Presenta diferencia significativa a las otras variedades. Las variedades 1 y 2 forman un grupo que no presentan diferencia significativa, la variedad 4, muestra una tendencia hacia las anteriores, pero presenta diferencia significativa en relación al grupo anterior. Las variedades 5 y 6 presentan valores muy bajos en la media y diferencias significativas en relación a las otras variedades. Este resultado sumado a los obtenidos en los siguientes estudios permitirá identificar la variedad con mejor respuesta al cultivo de meristemos.

Tabla N° 12. Evaluación de las variedades ensayadas en la determinación de altura de plántulas obtenidas en el cultivo de meristemos.

Variedades	Medias	Agrupamiento Tukey
3	2.2842	a
2	2.1058	a, b
1	1.9725	a, b
4	1.5675	b, c
5	1.2075	c
6	0.5258	d

alfa = 0.05 df = 648 MSE = 2.6552 DMS = 0.6013

Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa

En el trabajo realizado por Montes, (1997); refiere tratamientos con AIA, Cinetina y AG3, no señala diferencias significativas entre las yemas axilares y las apicales; cita el trabajo realizado por Villalobos, (1982); quien utilizo en igual proporción AIA y Cinetina, logrando plántulas provenientes de meristemos apicales con una longitud de 1.6 cm. en 72 tanto que las yemas axilares solo desarrollaron 1.1 cm. a los 32 días de cultivo. En el presente trabajo no se evaluó

la diferencia entre las yemas axilares y apicales. Utilizando 1.5 mg/L de AIA, 0.8 mg/L de Cinetina y 1.0 mg/L de AG3, se obtuvieron plántulas con un promedio de altura de 3.65 cm. a los 30 días de cultivo. • Par de hojas Los resultados se obtuvieron por conteo, incluyendo el par de hojas apicales, se realizó un análisis de varianza factorial 12 * 6. Los resultados se expresan en el cuadro 30 donde se indica que existen diferencias significativas entre los tratamientos y las variedades ensayadas, por lo que es necesario realizar la prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$).

*Tabla N° 13. Análisis de varianza factorial 12*6 para la variable N° de par de hojas de plántulas obtenidas en el cultivo de meristemos.*

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamiento	11	581.1777	52.8343	26.21	0.0001
Variedad	5	267.4611	53.4922	26.53	0.0001
Tratamiento*variedad	55	182.9388	3.3261	1.65	0.0029
Error	648	1306.4000	2.0160		
Total	719	2337.9777			

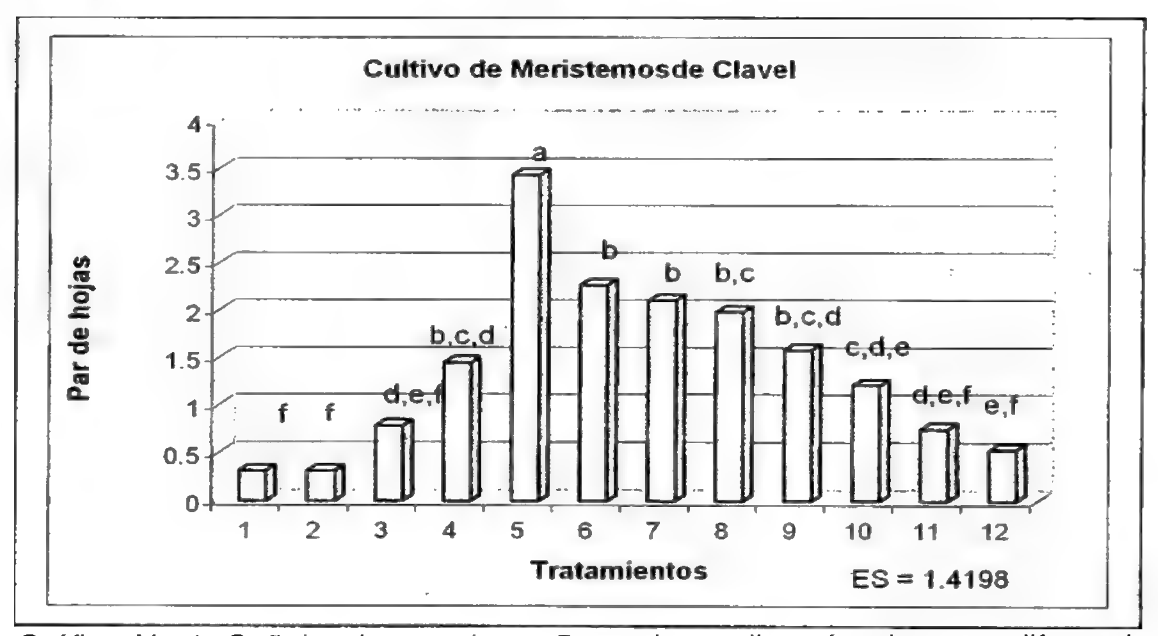


Gráfico N° 4. Señala al tratamiento 5 con la media más alta, con diferencia significativa en relación a los demás tratamientos, se obtiene una plántula vigorosa de buena talla y con pares de hojas periódicamente cercanas, glaucas de color verde.

Observamos que los tratamientos 6 y 7 no presentan diferencia significativa entre sí. Los tratamientos 8 al 12 forman un bloque en donde se presenta diferencia significativa y las medias son decrecientes, finalmente los tratamientos 1 y 2, no presentan diferencia significativa y tienen los valores de medias más bajos. La variedad 3 (Battle, S.A.), con el valor de la media más alta y con diferencia significativa es la que proporciona plántulas más vigorosas de mayor altura y con pares de hojas glaucas paródicamente cercanas de color verde; resultados que se indican en el cuadro 31, donde se observa que las variedades 1 y 2 presentan cierto parecido en las medias, lo que se manifiesta en el agrupamiento Tukey. Las variedades 4, 5 y 6 presentan diferencia estadística significativa, la respuesta al tratamiento es decreciente, son plántulas pequeñas con un mínimo de hojas delgadas. En el trabajo realizado por Montes (1997), refiere de 8 a 10 de hojas para plántulas provenientes de meristemos apicales y de 5 a 6 para plántulas obtenidas de meristemos axilares.

Tabla N° 14. Evaluación de las variedades en la determinación del N° de par de hojas de plántulas obtenidas en el cultivo de meristemos.

Variedades	Medias	Agrupamiento Tukey
3	2.0833	a
1	1.8500	a, b
2	1.8333	b, c
4	1.3917	b
5	0.8333	c
6	0.3750	c

alfa = 0.05 df = 648 MSE = 2.0160 DMS = 0.5239

Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa Con los resultados anteriores se confirma al tratamiento 5, adicionado con 1.5 mg/L de AIA, 0.8 mg.L'1 de Cinetina y 1 mg.L"1 de AG3 es capaz de desarrollar plántulas con 3.65 cm. de altura y 4 pares de hojas a los 30 días de cultivo.

Formación de raíz El desarrollo de raíz, le otorga a la plántula estabilidad y mayor capacidad de ser llevada del cultivo in vitro a cultivo en invernadero. El cuadro 32, que indica el análisis de varianza factorial 12*6 realizado; en los resultados obtenidos se observa que existen diferencias significativas entre las variedades y los tratamientos por lo que se procede a realizar una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$).

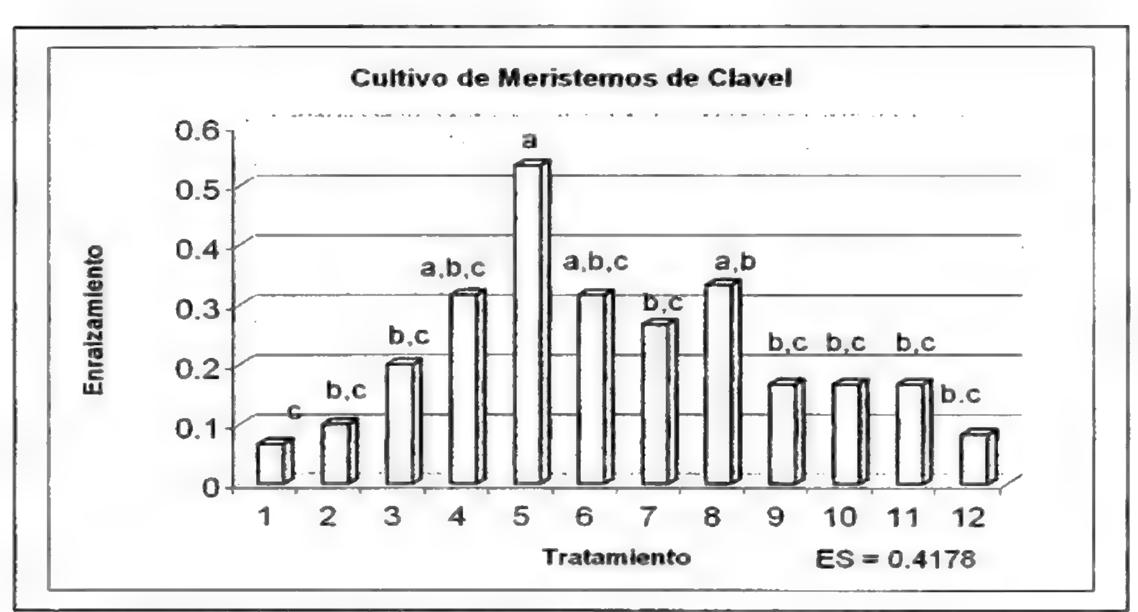
*Tabla N° 15. Análisis de varianza factorial 12*6 para la variable No. de plantulas enraizadas obtenidas en el cultivo de meristemos*

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamiento	11	11.8152	1.0741	6.12	0.0001
Variedad	5	11.2902	2.2580	12.87	0.0001
Tratamiento*variedad	55	9.2930	0.1689	0.96	0.5528
Error	648	113.7000	0.1746		
Total	719	146.0986			

El gráfico N° 5, señala la comparación de medias de los tratamientos evaluando el desarrollo de raíz, muestra que el tratamiento 5, presenta diferencia significativa, con la mayor capacidad de desarrollo de raíz, con cierta tendencia le siguen los tratamientos 4, 6 y 8, los que presentan diferencia significativa, la respuesta al tratamiento entre ellos fue muy semejante. Los tratamientos 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11 y 12 no presentan diferencia significativa. Los resultados anteriores permiten suponer que las concentraciones de los reguladores de crecimiento ensayados ejercen influencia en el desarrollo de la raíz, por lo que será necesario realizar un análisis de regresión. Nugent, (1991) señala que pare favorecer el desarrollo de raíz, las plantas fueron transferidas a un medio con la mitad de la concentración de MS, sin embargo, no proporciona resultados finales. Montes (1997); en relación a la emisión de raíces, señala un 25 % de plántulas enraizadas obtenidas de cultivo de meristemos apicales y un 21 % de plántulas

enraizadas obtenidas de cultivo de meristemos axilares y cita a Wetztein (1988) quienes observaron un 48 % de respuesta. En el presente trabajo no se estudió la diferencia de respuesta de entre los tipos de meristemos cultivados.

Gráfico N°5. Determinación de enraizamiento.



La comparación de medias de Tukey de las variedades se presenta en la tabla 16, que indican a la variedad N° 2 como aquella que tiene la capacidad de desarrollar raíz con mayor facilidad, presenta diferencia significativa en relación a las otras variedades, con la mayor respuesta. La variedad 1, 3 y 5 presentan diferencias no significativas y el menor comportamiento a los tratamientos en relación a la variable evaluada.

Tabla N°16. Evaluación de las variedades ensayadas en la determinación del N°de plántulas enraizadas obtenidas en el cultivo de meristemos.

Agrupamiento Tukey	Medias	N	Variedades
a	0.4250	120	2
a, b	0.3166	120	3
b, c	0.2250	120	5
b, c	0.2166	120	1
d, c	0.1500	120	4
d	0.0250	120	6

alfa = 0.05 df = 648 MSE = 0.1754 DMS = 0.1546

Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa

Después de evaluar cada uno de los resultados anteriores y considerando que el cultivo de meristemos tiene como objetivo principal la multiplicación masiva de clones y puede dar lugar a la formación de bancos de germoplasma y combinarse con técnicas de crio conservación, además de la obtención, conservación y establecimiento de individuos o poblaciones de plantas libres de virus (patógenos) (Pierik, 1991), es posible señalar al tratamiento N° 5, enriquecido con 1.5 mg/L de AIA, 0.8 mg/L de Cinetina y 1 mg/L de AG3, como el más adecuado, así como a la variedad 3 (semillas Battle, S. A.), como la de mayor productividad en el cultivo de meristemos, esta afirmación es avalada por las variables cuantitativas consideradas; como el desarrollo de plántulas vigorosas de buena talla, con tallos fuertes con pares de hojas glaucas periódicamente cercanas de color verde y aunque el análisis estadístico no la considera como la idónea para la formación de raíces, los resultados que proporciona pueden considerarse aceptables para proporcionar estabilidad a la plántula y mejorarse en otro protocolo de experimental. Como señala, Roest (1981) y Hurtado (1987), las citocininas se concentran en tejidos de crecimiento activo, predominantemente en las raíces, y de ahí son enviadas a los brotes, por lo que es importante en este trabajo establecer el efecto de la concentración de la cinetina en el desarrollo de la raíz por esta razón se aplicó una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$).

Tabla N° 17. Prueba de Tukey para enraizamiento por efecto de Cinetina.

Agrupamiento Tukey	Medias	Cinetina $mg.L^{-1}$
c	12.22	0.5
a	36.11	0.8
b	25.56	1
c	13.89	1.5

alfa = 0.0100 df = 72 MSE = 161.11

Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa

El análisis de regresión realizado para esta variable aparece en el gráfico N° 6, donde se observa que al aumentar la concentración de Cinetina en los tratamientos, aumenta el efecto de desarrollo de raíz, hasta una concentración de 0.9889 mg /L (punto de inflexión), lo que indica que es la concentración necesaria de Cinetina para lograr la mayor capacidad de enraizamiento y a una concentración mayor el efecto decrece.

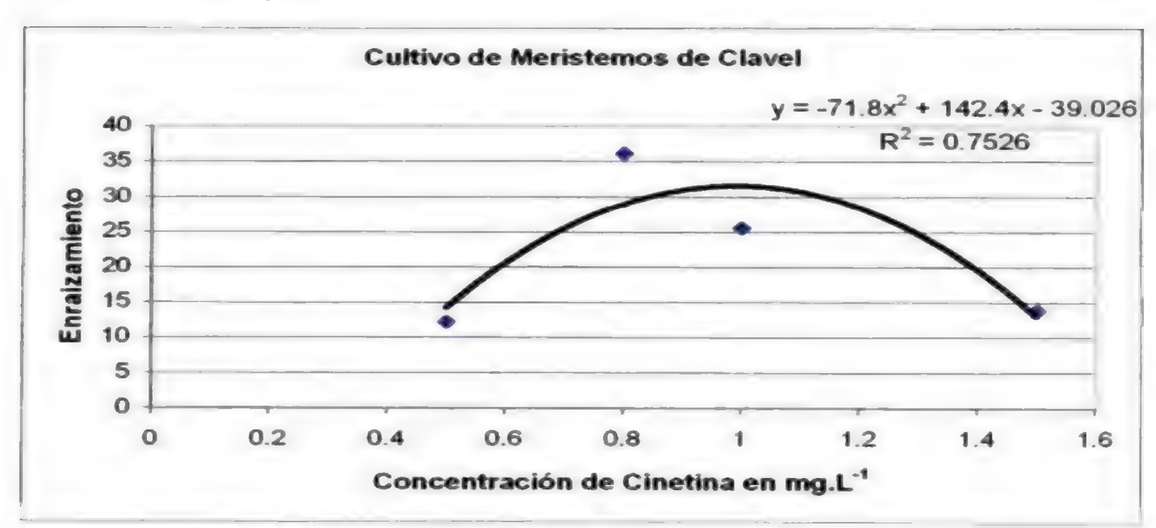


Gráfico N° 6. análisis de regresión para el enraizamiento por efecto de la concentración de Cinetina.

La interacción entre las concentraciones de los dos reguladores crecimiento ensayados: Cinetina * AG3. indica que existen diferencias significativas, por lo que se procede a realizar una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$).

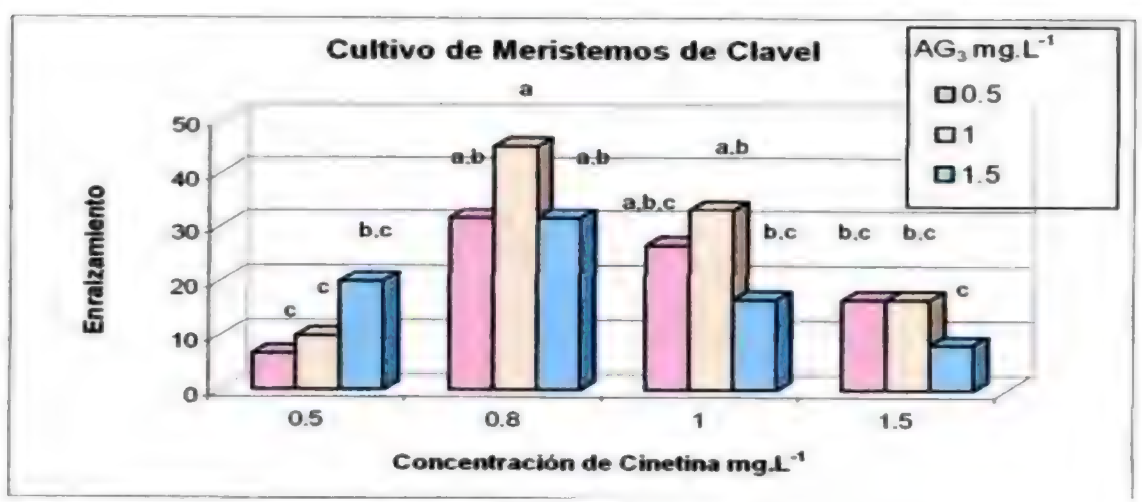


Gráfico N° 7. Interacción Cinetina AG3 para el desarrollo de raíz*

Para establecer el tratamiento que proporcione un resultado contundente, se realizó el análisis de regresión entre la concentración de Cinetina y los tratamientos de AG3 propuestos. En el gráfico N° 8 tenemos los análisis de regresión entre los tratamientos de Cinetina propuestos y las concentraciones de AG3 ensayadas. Observamos la formación de 3 curvas.

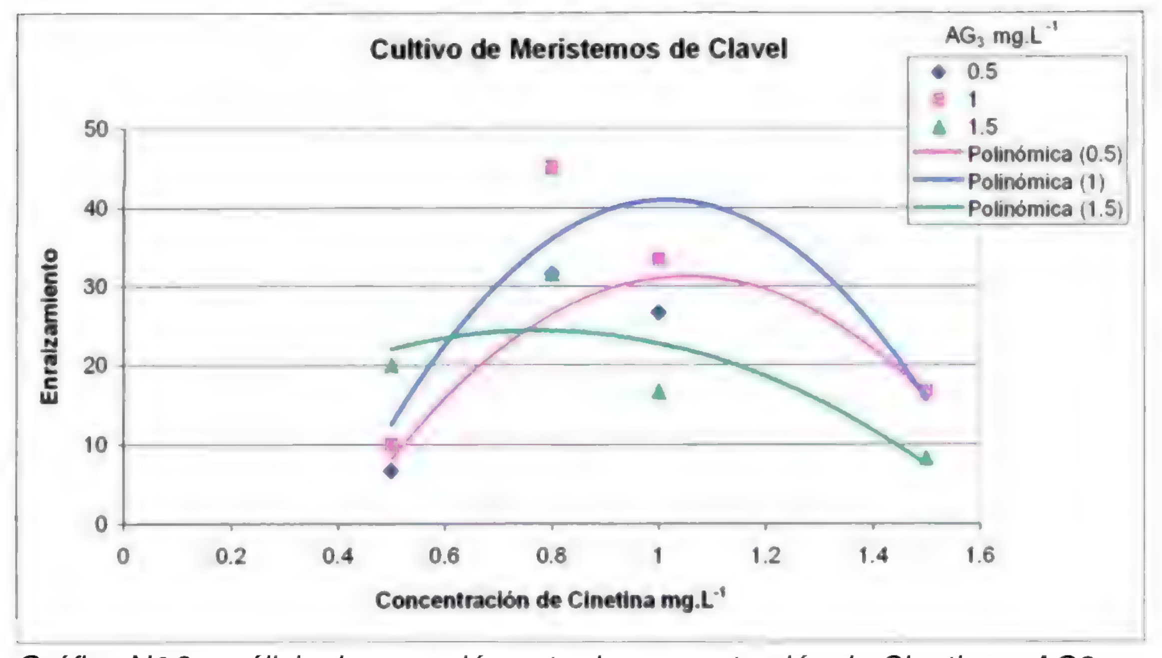


Gráfico N° 8. análisis de regresión entre la concentración de Cinetina y AG3.

La siguiente tabla resume las ecuaciones de regresión, este análisis se observó que el valor de R (coeficiente de correlación) en los 3 casos es estadísticamente significativo.

Tabla N° 18. Ecuaciones de regresión.

AG_3 mg.L^{-1}	Ecuación de regresión	R^2	R	P.I.. mg.L^{-1}
0.5	$y = -75.89x^2 + 159.69x - 52.738$	0.8668	0.9310	1.1089
1.0	$y = -107.37x^2 + 217.81x - 69.538$	0.8073	0.8984	1.0178
1.5	$y = -32.108x^2 + 49.64x + 5.2416$	0.6618	0.8135	0.7756

Se puede señalar que: el mayor número de plantas enraizadas se obtiene con 1. 178 mg/L de Cinetina y 1.0 mg/L AG3.

Para determinar teóricamente el número de plantas que podrían obtenerse mediante el cultivo de meristemos partimos de una semilla germinada que a los 45 días de su cultivo, desarrolla una plántula que aporta 5 meristemos, los que se traducen en 5 plántulas, las que a su vez a los 45 día proporcionan 25 meristemos y que durante 6 meses de reproducción será capaz de formar 3125 plántulas libres de virus vigorosas, con desarrollo de raíces adventicias que permitirá ser llevadas a cultivo de invernadero para su posterior desarrollo; este resultado exponencial (55) se obtiene al considerar el desarrollo de un brote, sin embargo es posible el desarrollo de brotes múltiples, lo que elevaría considerablemente el total.

d) Cultivo de yemas axilares y apicales

En las dos etapas, se utilizaron micro esquejes a partir de plantas de la variedad: 3, Semilla Batlle, S.A., establecidas en un cultivo aséptico, desarrolladas durante

45 días, en medio de cultivo MS, libre de reguladores de crecimiento en las condiciones de incubación ya descritas.

Tabla N° 19. Compuestos organicos modificados en la selection del regulador de cretimiento.

Compuestos Orgánicos	$mg.L^{-1}$
Tiamina	1
Ácido Nicotínico	1
Glicina	3

Los reguladores de crecimiento ensayados se presentan en el cuadro 19. Se realizaron20 repeticiones por 14 tratamientos para un total de 280 muestras; se evaluó el tratamiento de mayor capacidad de regeneración a los 30 días de cultivo, considerando las siguientes variables: la altura en cm. y el número de pares de hojas y de plantas enraizadas. El diseño experimental empleado fue completamente al azar para un análisis de varianza de clasificación simple con una prueba de comparación de medias de Tuckey ($p<0.05$).

Tabla N° 20. Concentración de reguladores de crecimiento ensayadas para el Cultivo de yemas axilares y apicales.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6
AG_3 ($mg.L^{-1}$)	0	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6

AG_3 = Ácido giberélico

Tratamientos	1	2	3	4	5
BAP ($mg.L^{-1}$)	0	0.1	0.5	1.1	1.5

BAP = 6 -bencil - aminopurina

Tratamientos	1	2	3
ANA ($mg.L^{-1}$)	0	0.1	0.2

ANA = Ácido naftalenacético

Tabla N° 21. Análisis de varianza para el cultivo de yemas axilares y apicales utilizando AG3.

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamientos	5	13.9416	2.7883	4.35	0.0012
Error	114	73.0500	0.6407		
Total	119	86.9916			

La observación anterior se confirma con la prueba de comparación de medias y el gráfico 9, muestra la diferencia entre el blanco y los tratamientos en que se empleó AG3, se observa que a los tratamientos 3 y 2 con el valor de la media más alta no presentan diferencia significativa, de igual forma los tratamientos 4, 5 y 6 no presentan diferencia significativa pero la respuesta es menor.

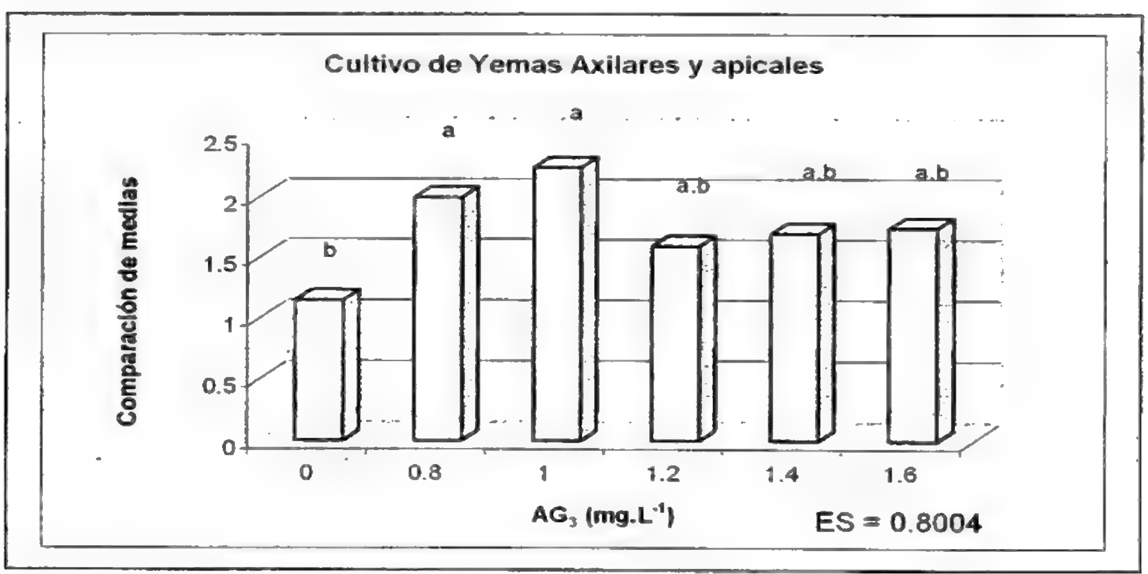


Gráfico N° 9. Evaluación de los tratamientos de AG3

Este resultado indica que la concentración alrededor de 1.0 mg/L proporciona buenos resultados sin embargo se consideró que es conveniente tomar en cuenta otros factores que señalaran el mejor desarrollo de la plántula, evaluando

su altura en cm., el No. de par de hojas y la presencia de raíz. Para la variable altura, el No. de par de hojas y el desarrollo de raíz, se aplicó un diseño experimental completamente al azar con un análisis de varianza de clasificación simple y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$). estos resultados señalan que existe diferencia significativa entre los tratamientos propuestos; en el caso de altura y No. de pares de hojas, se confirma el criterio anterior, sin embargo el desarrollo de raíz es una variable que marca la diferencia definitiva en esta evaluación; la figura 28 muestra al tratamiento que contiene 1.0 mg/L de AG3, como el más adecuado para efectuar el enraizamiento.

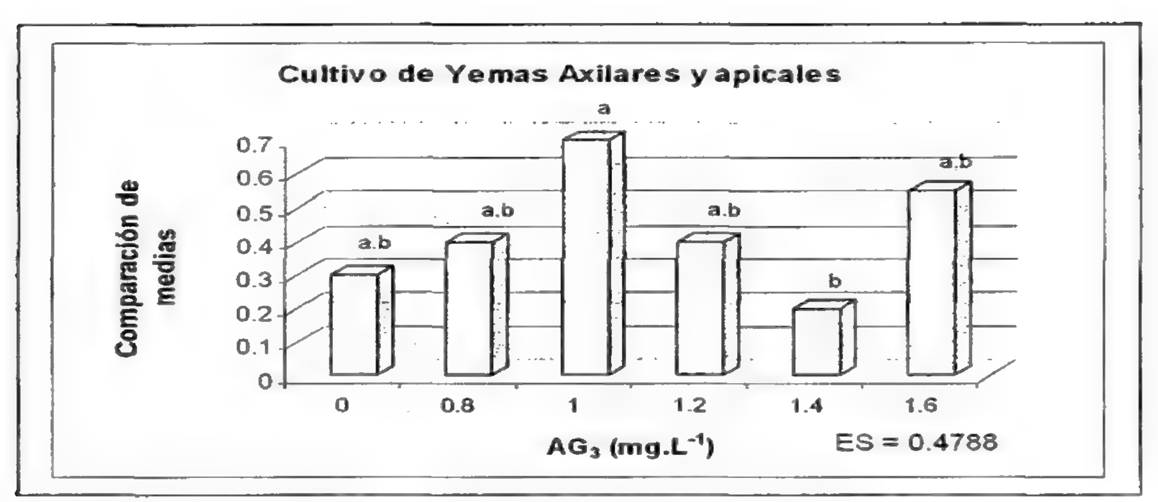


Gráfico N° 10. Evaluación de enraizamiento utilizando AG3.

En el caso de BAP, se ensayaron las concentraciones que se indican en el cuadro 19; se aplicó un diseño experimental completamente al azar con un análisis de varianza de clasificación simple que se expresa en el cuadro 37 y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$)

Tabla N° 21. análisis de varianza para el cultivo de yemas axilares y apicales utilizando BAP.

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamientos	4	8.6600	2.1650	7.53	0.0001
Error	95	27.3000	0.2873		
Total	99	3.9600			

Con respecto de ANA, se probaron las concentraciones que se indican en el cuadro 19; se aplicó un diseño experimental completamente al azar con un análisis de varianza de clasificación simple que se expresa en el cuadro 38 y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$), con el objeto de establecer la concentración optima que determine una eficiente multiplicación. Sin embargo, el desarrollo del explante es mínimo por lo que se descarta para tratamientos posteriores.

Tabla N° 22. Análisis de varianza para el cultivo de yemas axilares y apicales utilizando ANA.

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamientos	2	6.9333	3.4666	11.76	0.0001
Error	57	16.8000	0.2947		
Total	59	23.7333			

e) Multiplicación de yemas axilares y apicales.

En CFL, con la ayuda de pinzas y bisturí estériles se seccionaron las plántulas, para obtener micro esquejes de 0.5 a 1 cm. de longitud; se utilizaron frascos de 50 X 100 mm con 15 ml de medio, por tratamiento. Se ensayaron 50 repeticiones

por 6 tratamientos, para un total de 300 muestras. Los frascos se mantuvieron en las condiciones de incubación señaladas. El medio de cultivo MS fue complementado con las combinaciones propuestas que se presentan en el cuadro 20. El medio fue esterilizado en las condiciones señaladas. Se evaluó a los 30 días de cultivo el tratamiento con mayor índice multiplicación; así como la altura en cm. y el número de pares de hojas y plantas enraizadas. El diseño experimental empleado fue completamente al azar para un análisis de varianza de clasificación simple con una prueba de comparación de medias de Tuckey ($p<0.05$).

Tabla N°23. Tratamientos propuestos para la Multiplicación de yemas axilares y apicales.

	Tratamientos					
Componentes ($mg.L^{-1}$)	1	2	3	4	5	6
Tiamina	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Ác. Nicotinico	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Glicina	3.5	3.4	3.3	3.2	3.0	2.8
Inositol	100	100	100	100	100	100
Ác. Giberélico	1.5	1.4	1.3	1.2	1.0	0.9

Tabla N° 24. Análisis de varianza para la multiplicación de yemas axilares y apicales

Parámetros	GL	SC	CM	FC	Pr>F
Tratamientos	5	13.8733	2.7746	11.38	0.0001
Error	114	35.1200	0.2438		
Total	119	48.9933			

El análisis estadístico indica diferencias significativas entre los tratamientos propuestos, la prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$) muestra homogeneidad entre los tratamientos y no permite establecer con claridad el tratamiento más adecuado, por esta razón es necesario considerar otros factores

cuantitativos, tales como: a) el desarrollo de brote múltiples, b) la altura expresada en cm., de los brotes de mayor talla, c) el par de hojas por explante y d) el desarrollo de raíz; estas observaciones permitirán emitir un resultado definitivo. En un estudio semejante Montes, (1997) ensaya dos propuestas de medio de cultivo adicionando al MS 0.8 a 1.0 mg/L de tiamina, 0.8 a 1.0 mg/L de ácido nicotínico, 3 a 3.5 mg/L de glicina y 100 mg/L de inositol, y de 1.0 a 1.5 mg/L de AG3; refiere los mejores resultados evaluando la altura de los brotes para el medio de cultivo que contenía la menor concentración del regulador; también compara la respuesta entre explantes apicales y subapicales en posiciones 1, 2 y 3 obteniendo los mejores resultados para los primeros, con regeneración de plántulas con mayor talla. Bon (1998); utiliza MS suplementado con 50 mg/L myo inositol, 500 mg/L de caseína hidrolizada, 2 mg/L de glicina, 1 mg/L de tiamina, 1 mg/L de clorhidrato de piridoxina, 1 mg.L'1 ácido nicotínico y 20 g/L de sacarosa, experimentan dos cultivares y ensaya los macronutrientes dé % B5, Knop, 1/4 MS, 2/3 QL y 2/3 de SH determinando mejores resultados en V2 MS con el desarrollo de brotes de mayor longitud; señala que los reguladores de crecimiento ejercen influencia de acuerdo a la concentración utilizada y que posteriormente a las 4 semanas de cultivo hay una inhibición en el crecimiento de las yemas axilares en comparación con el control y los mejores resultados los obtiene al combinar 4.4 uM de BA y 2.5 uM de AIB. En el presente trabajo se utilizó una formulación semejante a la planteada anteriormente, no se evaluó la posición de los explantes empleados y como se mencionó anteriormente se utilizó únicamente AG3. En una distribución completamente al azar se considera en los resultados de este experimento, el desarrollo de los explantes nombrando al brote 1 a aquel que desarrollo la mejor talla, al brote 2

al siguiente, y así sucesivamente; para la variable altura, se aplicó un diseño experimental completamente al azar con un análisis de varianza de clasificación simple y una prueba de comparación de medias. En el gráfico 11, se observa la altura que presentaron los 3 primeros brotes desarrollados durante esta metodología, en cuanto al primer brote existe diferencia significativa entre los tratamientos, los tratamientos 6 y 5, presentaron la mayor respuesta; en relación al segundo brote, no existe diferencia significativa entre los tratamientos, con excepción de! tratamiento 1 que presento la menor respuesta, con respecto al tercer brote, estos presentan un escaso desarrollo, existe diferencia significativas entre los tratamientos, sin embargo nuevamente los tratamientos 5 y 6 son los que desarrollan mayor altura.

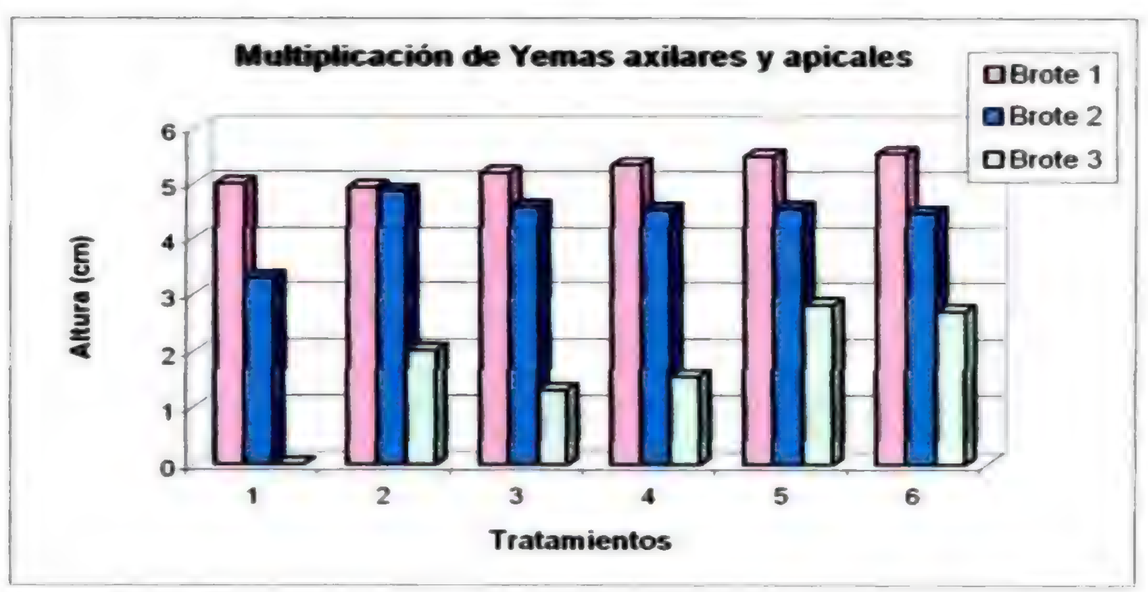


Gráfico N° 11. Evaluación de altura de brotes.

Para la variable pares de hojas se observó que los tratamientos que presentaron mayor altura y desarrollan mayor número de brotes, presenten mayor número de pares de hojas totales. El diseño experimental aplicado fue completamente al azar, con un análisis de varianza de clasificación simple y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$). El gráfico 12, muestra que, para el

primer brote, existe diferencia significativa, los tratamientos con los mejores resultados son el 6 y 5; en cuanto al segundo brote, no se presenta diferencia significativa entre los tratamientos a excepción del tratamiento 1 el cual solo desarrolla dos brotes; en relación al tercer brote existe diferencia significativa, y los tratamientos 6 y 5 proporcionan los mejores resultados.

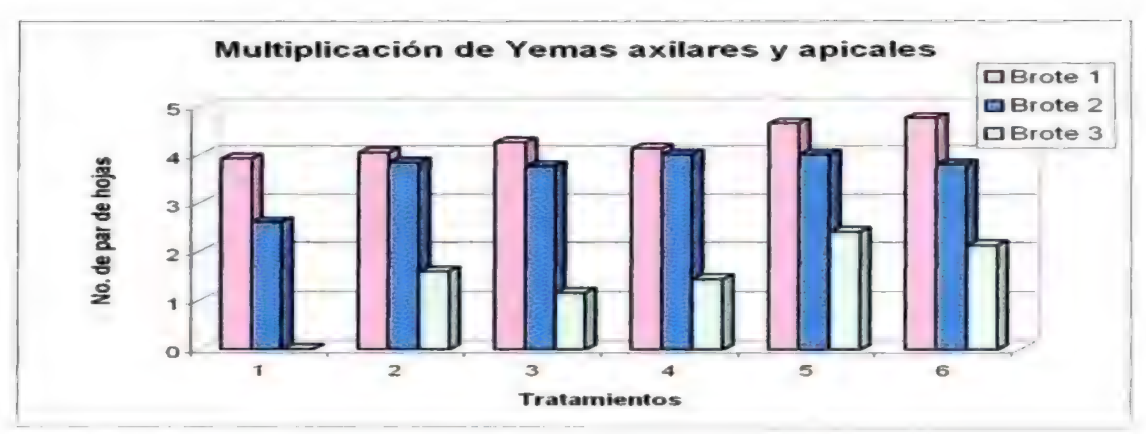


Gráfico N° 12. Evaluación del N° de par de hojas de brotes.

En el caso de enraizamiento, el diseño experimental aplicado fue completamente al azar, con un análisis de varianza de clasificación simple y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$), el cual nos indica que no hay diferencia significativa entre los tratamientos para esta variable. Con los resultados obtenidos entre las dos etapas de experimentación se aplicó un diseño experimental completamente al azar con un análisis de varianza de clasificación simple con una prueba de comparación de medias de Tukey ($p<0.05$), que permitiera conocer la diferencia entre los tratamientos ensayados y establecer el tratamiento más eficaz en la micropropagacion del clavel, por medio del cultivo de yemas axilares y apicales; los resultados obtenidos se presentan en el gráfico13, en ella se aprecia que existe diferencia significativa entre los tratamientos; los mejores resultados los proporcionan los tratamientos de multiplicación de yemas axilares y apicales, seguidos por el uso de AG3, no

así los otros reguladores de crecimiento ensayados, este resultado se atribuye al hecho de que los tratamientos de multiplicación cuentan con nutrientes que favorecen el desarrollo del explante sumado a la influencia que ejerce el AG3.

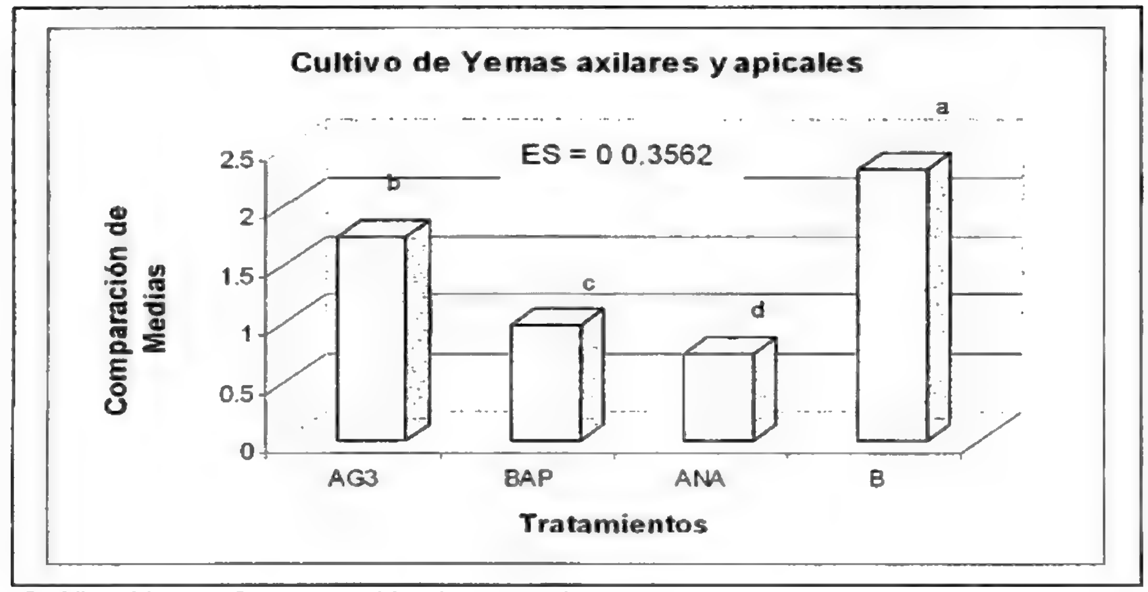


Gráfico N° 13. Comparación de tratamientos.

Analizando la información obtenida es posible señalar que al utilizar 1 mg/L de AG3 se obtienen explantes con 4.2 cm de altura y 4 pares de hojas en promedio. El tratamiento 5 compuesto por: 0.8 m/L de tiamina, 0.8 mg/L de ácido nicótico, 3.0 mg/L de glicina 100 mg/L de inosiltol y 1 mg/L de AG3, permite el desarrollo de por lo menos 3 brotes múltiples con una altura en promedio de 5.5 a 2.8 cm y formación de 4.7 a 2.4 pares de hojas por brote en promedio.

f) Embriogénesis

- Inducción de callos embriogénicos.

Se utilizaron 100 explantes por variedad, tomando 75 segmentos centrales de hojas de los primeros tres pares y 25 segmentos de tallo, los que se cultivaron en medio B5H, que se presenta en el cuadro 14, en las condiciones señaladas.

Los resultados obtenidos en la inducción del callo embriogénico se expresan en la tabla 25.

Tabla N°25. Respuesta del tratamiento de inducción de callo embriogénico.

Variedad	% Callo friable (segmentos de hoja)	% Callo friable (segmentos de tallo)
1	18.66	4
2	28	8
3	12	0
4	5.3	0
5	2.66	0
6	0	0

Durante este experimento las variedades presentaron comportamiento muy diferentes, esto es atribuible a las características genotípicas. Aunque la mayoría de las variedades desarrollaron la formación de callo, solo una pequeña proporción presenta un aspecto friable, considerados aptos para continuar el proceso de proliferación celular en el protocolo propuesto; la mayoría de los callos formados son de aspecto compacto, de color verde claro, otros con signos de fenolizacion; estos resultados no se evaluaron en el presente trabajo, únicamente se eligió a los callos de consistencia friables para continuar el proceso.

Las variedades 1, 2 y 3 presentaron respuesta positiva al tratamiento de inducción, no así las variedades 4, 5 y 6. Los segmentos de hojas formaron mayor número de callos friables que los segmentos de tallo; por lo que se elige como explante a los primeros. En la variedad 2, Vita, que presento un 32% de respuesta total, se observa que, durante el periodo de inducción, se aprecian dos etapas de crecimiento, la primera con duración de 7 a 10 días, considerada como preparatoria, en la que ocurre una alteración metabólica celular. La cicatrización

de los explantes, se observó en los primeros 5 días, con la presencia de un aumento de tejido de color blanco, esta etapa se caracterizó por un crecimiento celular lento, que inicio en los bordes de los explantes seccionados, este desarrollo se monitoreaba a través de un Microscopio estereoscópico, esto se atribuye a que los explantes estaban en un periodo de adaptación a las condiciones de cultivo

- Suspension celular

Durante esta etapa el tejido calloso aumenta de masa celular al máximo, los callos de apariencia friable fueron transferidos como lo indica la metodología a medio liquido con la misma formulación que el medio de inducción. La renovación del medio, cuando el explante está establecido tiene por objeto evitar que el explante se debilite, debido a que el crecimiento y la multiplicación celular son tan intensas que provocan gastos de los nutrientes del medio. Con el propósito de seguir el desarrollo de las variedades, se tomó la decisión de continuar la experimentación en forma independiente, de tal manera que fuera posible identificar las l/neas embriogénicas. Los explantes obtenidos a partir de hojas, particularmente las variedades 1, 2 y 3; se disgregaron con facilidad mostrado aumento de masa celular; en el caso de las variedades 4 y 5, aunque el callo era de apariencia friable se formaron racimos celulares y no se presentó desarrollo celular. En el caso de los callos obtenidos a partir de segmentos de tallo, el tejido no se disgrego y no se presentó aumento de masa celular. La suspensión celular se initio con matraces conteniendo 30 ml de medio inoculados con callo embriogénico disgregado, los primeros 4 días no se observa un aumento en la masa celular, esto se atribuye que el explante se encuentra en la etapa de adaptación a las condiciones nutricionales. Entre los 5 y 10 días se observa un

aumento considerable en la masa celular, el material vegetal se encuentra ya completamente disgregado, la velocidad de división celular se encuentra en fase exponencial. El medio adquiere un color cremoso y ocupa más de la mitad del medio de cultivo. En el presente trabajo no se evaluó la curva de crecimiento celular.

Tabla N°26. Resultados de los tratamientos de Suspensión celular.

Variedad	% Tratamientos de Suspensión celular con crecimiento
1	5
2	12
3	2
4	0
5	0
6	0

Se desarrolla crecimiento celular en 3 variedades ensayadas identificándose líneas embriogénicas con el tratamiento propuesto.

- Análisis comparativo de las metodologías de micro propagación.

el material vegetal utilizado, las variedades Fito, Vita, Batlle, S.A., de procedencia extranjera, presentan las siguientes ventajas: material vegetal de alta calidad, libre de contaminación por encontrarse empacado al vaefo, con comprobado nivel de reproducibilidad, con la capacidad de respuesta ante cualquier tratamiento; sin embargo, las desventajas que presentan son: dificultad para conseguirlas debido a que se trata de un producto de importación, y el costo por semilla es elevado por el tipo de cambio vigente del dólar.

La variedad Lone Star Seed Co., Happy Flower Mexicana, S.A, y las semillas a granel; presentan niveles de contaminación, no se asegura su reproducibilidad,

por lo que, la capacidad de respuesta ante los tratamientos es poco segura. La ventaja es que se adquieren con facilidad y el costo por semilla es bajo. Es recomendable asumir el costo de las variedades Fito, Vita y Batlle, S.A., porque queda garantizada la respuesta a los tratamientos propuestos

La facilidad de obtención de los explantes debe considerarse para cada metodología. En el cultivo de meristemos, obtener explantes 0.5 mm., requiere contar con un Microscopio estereoscópico de buena resolución y suficiente habilidad en la extracción y manejo del explante para su cultivo, es importante enfatizar que esta metodología trae como consecuencia la obtención de cultivos libres de virus; en el caso del cultivo de yemas y la embriogénesis no se requiere equipo especializado, basta con equipo de disección, ya sea para cortar esquejes o seccionar una hoja o un tallo. Si sumamos a la multiplicación vegetal, el saneamiento del cultivo la metodología de meristemos es la más apropiada.

En el cultivo de meristemos se logró la conversión del 100 % de los meristemos cultivados, en medio MS adicionado con: 1.5 mg/L de AIA, 0.8 mg/L de Cinetina y 1 mg/L de AG3, obteniéndose plántulas normales sanas y fuertes de 3.5 cm de altura y 4 pares de hojas, libres de vitrificación, erectas. Por medio de un análisis de regresión es posible señalar que con 1.0178 mg/L de Cinetina y 1.0 mg/L de AG3 se obtiene la mayor capacidad de enraizamiento. Para los tratamientos de cultivo de yemas apicales y axilares, de clavel (*Dianthus caryophyllus L.*) , se determina que el AG3 ejerce un influencia altamente positiva en el desarrollo de los explantes; por lo que se Integra a los tratamientos que utilizan el medio MS adicionado con Tiamina, 0.8 mg/L de Ácido nicotínico y 3.0 mg/L de Glicina; las bondades de esta metodología es que proporcionan la formación de brotes múltiples (un mínimo de 3) con 5.5 ±0.1 cm de altura, con 5 ± 1 pares de hojas

en promedio (considerando únicamente al brote de mayor talla). Con respecto a embriogénesis, se prueba una metodología nueva no aplicada antes en clavel y reportada como exitosa en alfalfa; considera la inducción del callo embriogénico en una modificación del medio de Gamborg (1968), llamada B5H, adicionado con 1 mg/L1 2, 4 -D y 0.2 mg/L de Cinetina, obteniéndose un 27 % de formación de callos friables utilizando segmentos de hojas de la variedad Vita. La suspensión celular, presento un desarrollo celular un 12% de los explantes cultivados de la variedad Vita, y menor porcentaje para las otras' variedades. Los aglomerados celulares transferidos a cajas de Petri, alcanzan un 100 % de conversión a embriones somáticos de la variedad Vita y un 8% de la variedad Fito; se cuantifica un promedio de 20.7 embriones germinados por aglomerado celular en la variedad Vita; 14.5 embriones germinados en la variedad Fito. 101 Las tres metodologías son altamente reproductivas, los resultados obtenidos así lo demuestran; las ventajas y desventajas que presentan cada una de ellas se relaciona con todos los factores que contribuyen a su desarrollo, no solo con la eficiencia de reproducibilidad sino también con las condiciones de trabajo con que se cuente.

Efectividad reproductiva

En el cultivo de meristemos, tenemos que a partir de 1 semilla en un periodo de 45 días nos proporciona una plántula con más de 7 cm. de altura, la que se secciona para obtener 5 meristemos, los que después de un periodo de cultivo de 30 días, darán origen a 5 plántulas sanas libres de virus, si estas a su vez se subcultivan sus meristemos tendremos, en un periodo de 6 meses de cultivo continuo la posibilidad de obtener 3 125 plántulas normales, sanas, vigorosas, libres de vitrificación, con formación de raíz, capacidad reproductiva y con la

factibilidad de desarrollarse posteriormente en condiciones de invernadero. De igual manera en el cultivo de yemas axilares y apicales, partimos de una plántula con 45 días de cultivo que proporciona 5 esquejes, los que después de un periodo de cultivo de 30 días darán origen a 3 brotes, lo que se traduce en 15 explantes, que en un periodo de 4.5 meses de cultivo continuo darán lugar a 13 500 plántulas con capacidad de sobrevivir a condiciones ex vitro\ esta metodología comparada con el cultivo de meristemos supera en un 400 % aproximadamente la tasa de reproducibilidad en un periodo menor de tiempo. La embriogénesis somática es una de las metodología más eficientes en la multiplicación masiva, a partir de una línea embriogénica en 72 días es posible obtener 4320 plántulas aproximadamente superando al cultivo de meristemos y una vez que se logre afinar los procedimientos para reducir margen de error sea y sea posible continuar la búsqueda de líneas embriogénicas que garanticen los resultados, así como contar con el equipo y condiciones necesarias para su aplicación, desarrollando habilidades en el manejo de la técnica de trabajo.

Después de realizar la revisión anterior considerando las ventajas de las metodologías propuestas es posible hacer las siguientes recomendaciones:

- Utilizar las variedades Vita, Fito y Batlle S.A., a fin de asegurar la respuesta de los ensayos realizados.
- Aprovechar el establecimiento de cultivos asépticos que garantizan el trabajo experimental posterior.
- Aplicar la metodología de cultivo de meristemos con el objetivo de obtener una población de explantes saneados.
- Aplicar la metodología integral de micropropagación propuesta para obtener una multiplicación del material vegetal libre de virus.

- Afinar la metodología de embriogénesis con el objetivo de hacerla mas eficiente para que posteriormente se aplique con la certeza de multiplicación exponencial del material.

4.4.2. TABLA 5, ANEXO 2

a) Medio de cultivo y condiciones.

Durante la fase de establecimiento, el medio de cultivo (MS) fue suplementado con 3% de sacarosa y 0.1 ppm de Kinetina. El agente gelificante usado fue Agar OXOID® al 7 %. Estos explantes fueron mantenidos durante 30 días en este medio. Posteriormente, fueron transferidos a medio MS sin reguladores de crecimiento y 7 % de agar por 30 días.

El material proveniente de la fase de establecimiento se utilizó para iniciarla. Los brotes diferenciados que presentaban 2 nudos fueron cortados y transferidos a medio MS, con densidad de 2 o 3 explantes por recipiente. Los recipientes fueron cubiertos con tapas Magenta® para permitir el intercambio gaseoso con el ambiente exterior. En esta fase se calculó la TP y TVM para cada variedad.

Dentro de esta fase se definieron 2 ciclos de multiplicación a realizarse. Estos se generaron por la respuesta de los explantes en las condiciones in vitro. Cada ciclo tuvo una duración de 25 días. Adicionalmente se evaluó la consistencia del medio con respecto a la hiperhidratación de los explantes. Se utilizaron 2 concentraciones de agar OXOID ® 7 % (Control) y 8% (T1).

b) Análisis de la información

En el gráfico 14, se observa el comportamiento de las muestras de cada variedad sometidas a cada método de atenuación del virus. En general, las cinco variedades actúan de manera similar respecto a cada método. La variedad Marfil en la combinación de ambos métodos presenta valores de 0,1580 nm siendo estadísticamente iguales a los presentados por el control negativo (0,1303 nm). Las demás variedades muestran diferencias estadísticas con el control negativo respecto con los valores promedio de absorbancia.

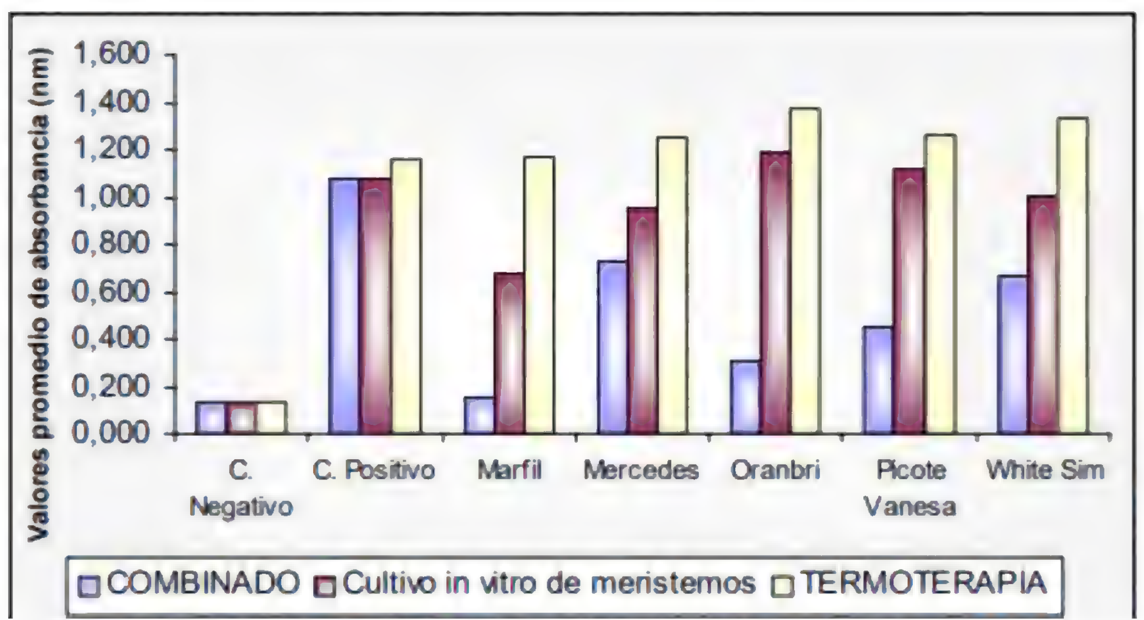


Gráfico 14. Resultados de la prueba "DAS – ELISA", en las cinco variedades y con cada método de atenuación de virus, a partir de los valores promedio de absorbancia (nm).

Los resultados obtenidos en la prueba ELISA con material vegetal sometidos únicamente a termoterapia o a cultivo in vitro de meristemos presentaron valores promedio de absorbancia de 1,279 y 0,987 nm respectivamente, siendo estadísticamente iguales a los del control positivo (1,114) (Figura 7). Mientras que a las muestras en las que se aplicaron la combinación de los dos métodos, los valores presentados fueron (0,459 nm) próximos al control negativo (0,130 nm). Los esquejes que fueron sometidos al método de termoterapia presentaron

valores desde 1,373 hasta 1,166 nm de absorbancia en las variedades. Estos resultados fueron comparados con el control positivo (1,164 nm) y no se mostraron diferencias estadísticas entre sí. Lo que significa que la concentración del CarMV no se disminuyó en ninguna de las muestras.

Las muestras sometidas únicamente al método de cultivo in vitro de meristemos y la combinación de este con termoterapia presentaron diferencias significativas con el control positivo, ya que los valores obtenidos por las muestras sometidas al método de cultivo in vitro de meristemos fueron de 0,9878 nm, las de los métodos combinados mostraron valores de 0,459 nm y las del control positivo fueron 1,114 nm Sin embargo los dos métodos fueron diferentes significativamente entre sí y con respecto al control negativo (0,130 nm) (gráfico 15).

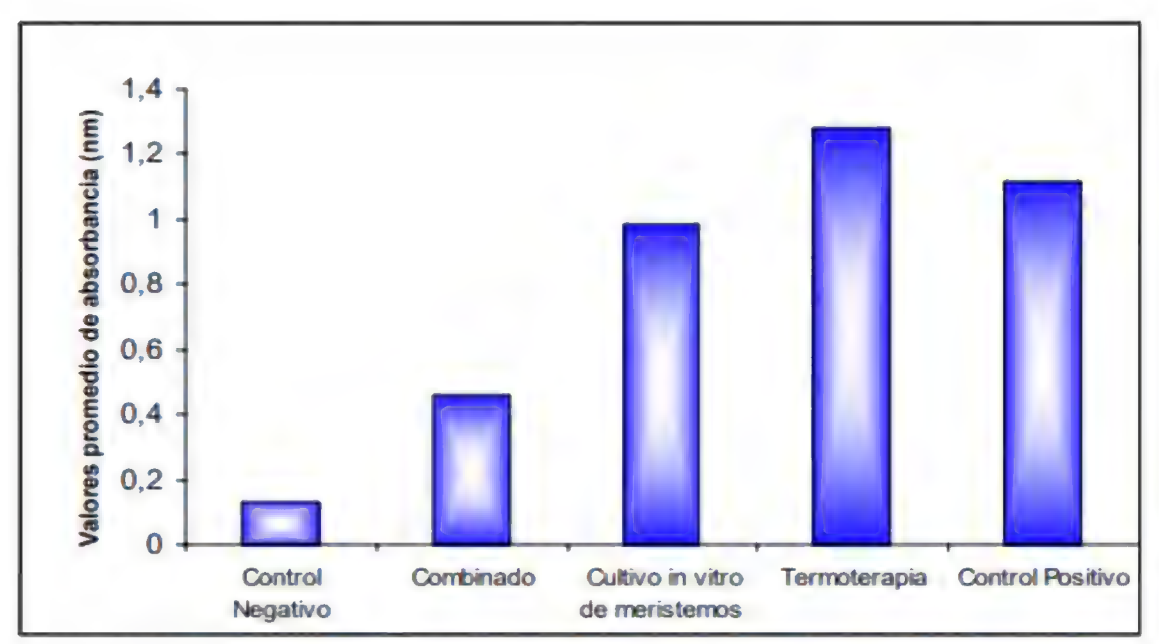


Gráfico N° 15. Efecto de los métodos para la atenuación del virus moteado de clavel (CarMV) en esquejes de cinco variedades de clavel.

Los resultados obtenidos en la prueba ELISA con meristemos provenientes del método de cultivo in vitro presentan valores promedio de 0,987 nm siendo menores que las muestras sometidas al método de termoterapia (1,279 nm) pero

mayores que el que combina ambos métodos (0,459 nm). Adicionalmente la diferencia con el control negativo es significativa (0,130 nm). Esto indica que el material sometido únicamente a cultivo in vitro también presenta el CarMV.

Las muestras que se sometieron a la combinación de los 2 métodos (termoterapia y cultivo in vitro de meristemos) presentaron los valores promedio más bajos de absorbancia (0,459 nm), dato significativamente menor a los valores del material vegetal proveniente de los métodos de termoterapia y cultivo in vitro de meristemos por separado (1,279 y 0,987 nm respectivamente). Sin embargo, también presenta diferencias con el control negativo (0,130 nm). Este resultado demuestra que la utilización de los dos métodos parece incrementar la posibilidad de reducir la concentración del virus en las plantas sin ser erradicado completamente.

PARA EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN

El primer material vegetal sometido a termoterapia presentó una respuesta de supervivencia muy baja, especialmente en las variedades Picote Vanesa y Jun con un porcentaje del 41,7 y 11,1 % respectivamente. En las variedades White Sim y Marfil el 70 % de los esquejes sobrevivieron (Gráfico 16).

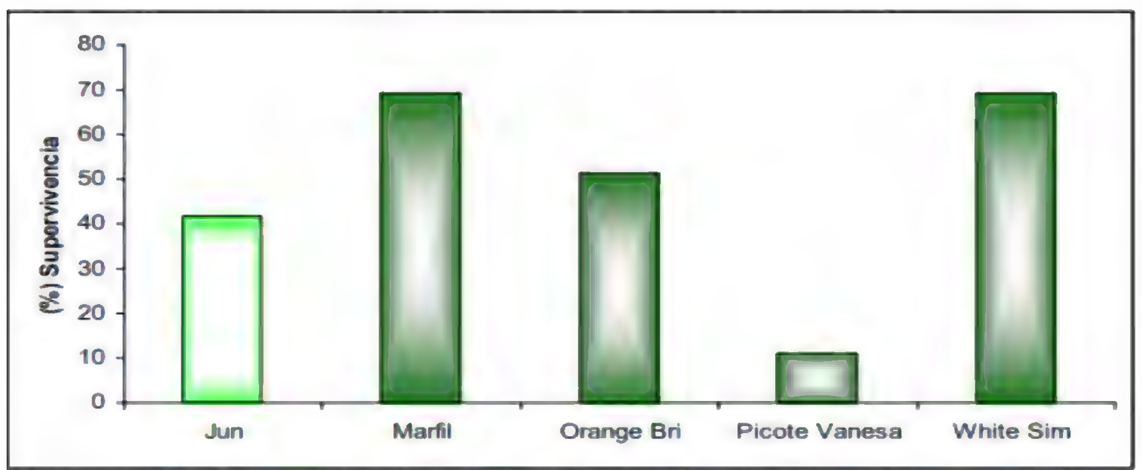


Gráfico 16. Porcentaje de supervivencia de los esquejes sometidos a termoterapia.

La reducción en el número de esquejes también pudo estar relacionada con la presencia de hongos en las láminas foliares. Esta respuesta se atribuye a la condensación de vapor generado por la transpiración de las plantas, que sumado a una temperatura alta (38ºC) generaron el ambiente adecuado para el desarrollo de microorganismos.

En el gráfico 17, se observa que las variedades Orange Bri y Marfil perdieron el total de meristemos sembrados (74 y 109 respectivamente), razón por la cual no hubo una respuesta respecto al desarrollo de brotes. Por otro lado, la variedad White Sim obtuvo los valores más altos para el número de brotes perdidos (168) y desarrollados (34) respecto a las demás variedades.

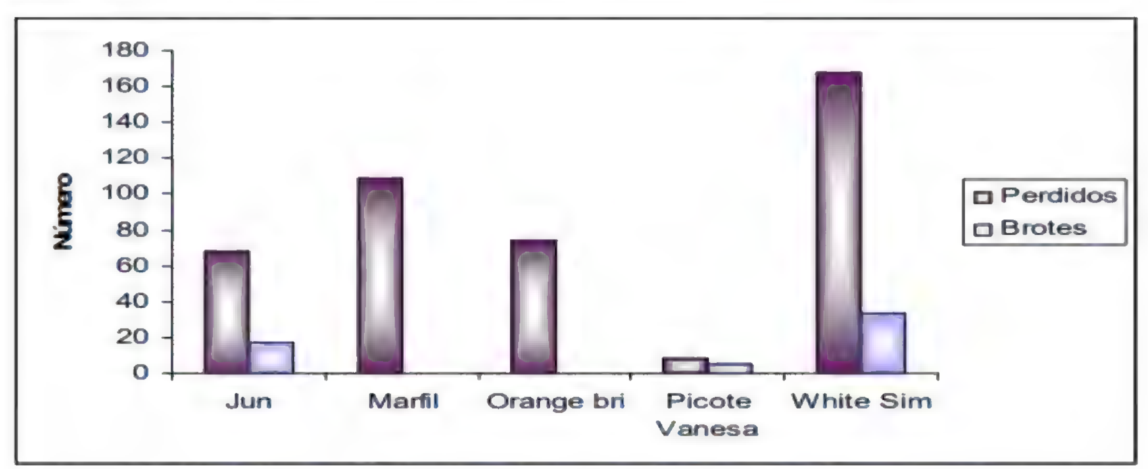


Gráfico N° 17. Número de brotes desarrollados y perdidos para cada variedad en el proceso de micropropagación.

ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE MERISTEMOS

De acuerdo con el análisis de varianza se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las variedades con respecto a la tasa de pérdida. Las variedades Marfil y Mercedes presentaron una tasa de pérdida similar 49,2 % y 49,3 % respectivamente, al igual que las variedades Orange Bri (68,4 %) y Picote Vanesa (63,2 %), sin embargo, entre estos dos grupos si se presentaron diferencias. En el gráfico 18 se observa el porcentaje de la tasa de

pérdida para cada variedad. Las variedades que presentan la misma letra no difieren entre sí.

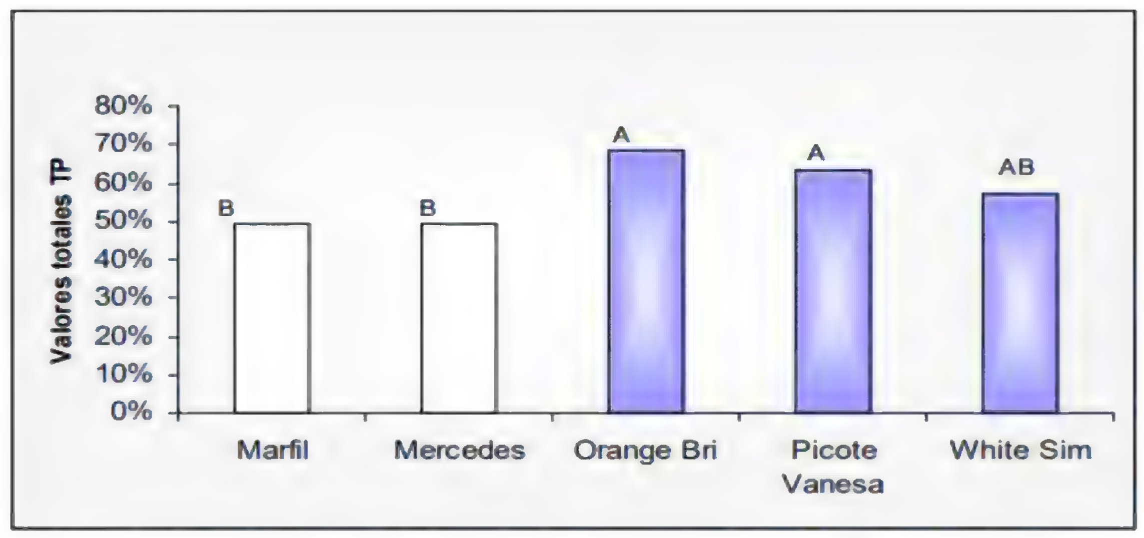


Gráfico N° 18. Valores totales de la Tasa de Pérdida (TP) en la fase de establecimiento in vitro de las 5 variedades de Dianthus caryophyllus.

A los 20 días se volvió a calcular la tasa de pérdida para cada una de las variedades y se encontraron diferencias estadísticas entre éstas. Las variedades Mercedes (17.6 %), Orange Bri (17.2 %), Picote Vanesa (10 %) y White Sim (9.8 %) fueron agrupadas por la prueba Duncan, presentando una tasa de pérdida similar mientras que la variedad Marfil presentó la mayor tasa de pérdida con un valor de 66.2 % significativamente superior respecto a las demás variedades (Gráfico 18).

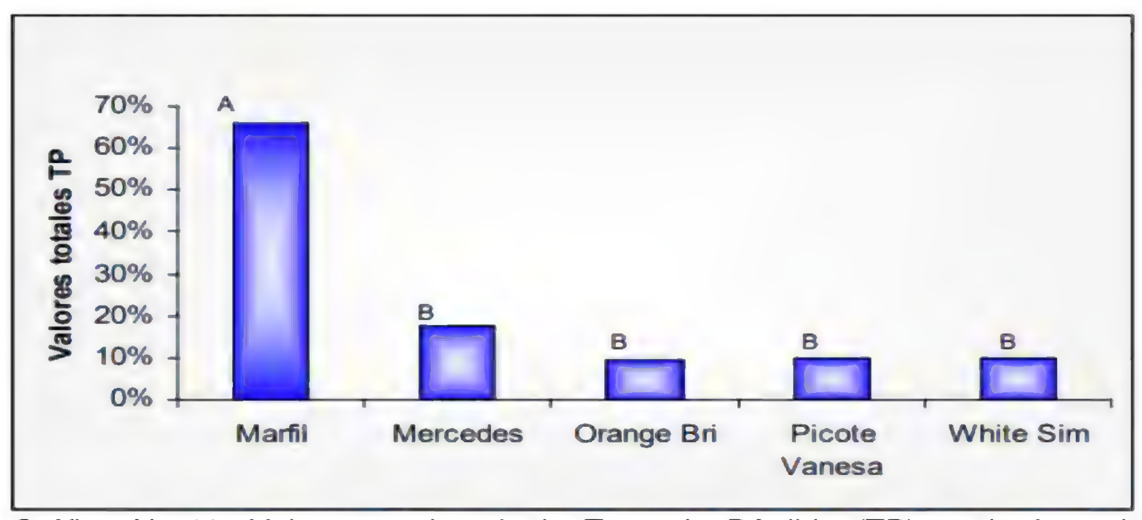


Gráfico N° 18. Valores totales de la Tasa de Pérdida (TP) en la fase de establecimiento in vitro de las 5 variedades de Dianthus caryophyllus.

PROPAGACIÓN IN VITRO

En la fase de propagación in vitro se calculó la tasa de velocidad de multiplicación y la tasa de pérdida para cada variedad. A la variedad Marfil no se le cuantificó la tasa de velocidad de multiplicación, porque los brotes no pudieron ser multiplicados ya que el tamaño no era adecuado.

CICLO DE MULTIPLICACIÓN 1

En el gráfico 19 se observa el comportamiento de cada variedad respecto a la tasa total de velocidad de la multiplicación, donde se aprecia una mayor tasa de multiplicación en la variedad White Sim, cercana a 0.66 explantes/día. La variedad que presentó la menor tasa de multiplicación fue Orange Bri (0.22 explantes/día). Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas entre las variedades.

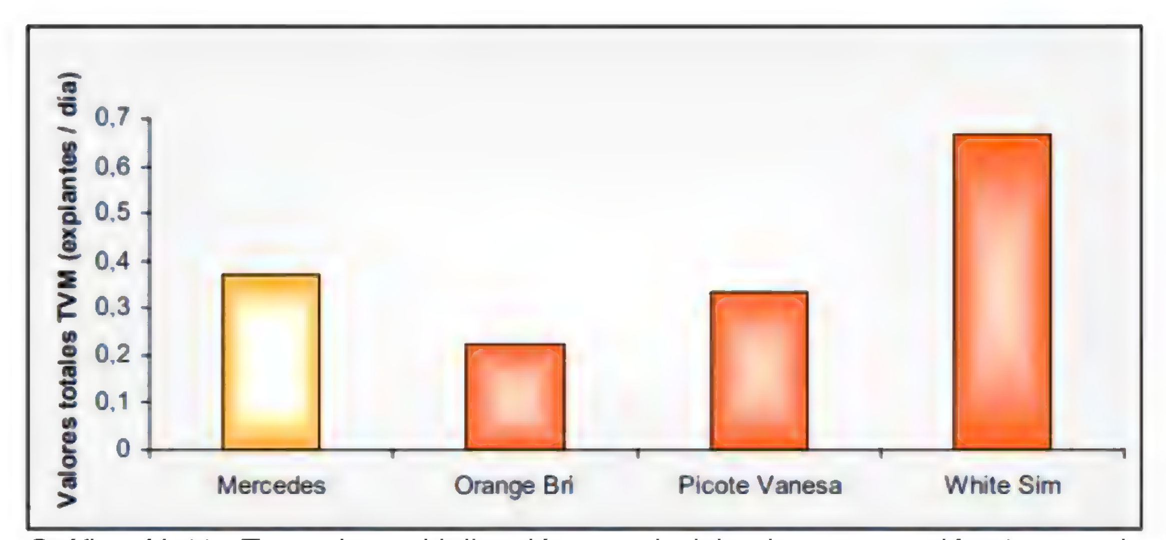


Gráfico N°19. Tasa de multiplicación en el ciclo de propagación 1, para las variedades Mercedes, Orange Bri, Picote Vanesa y White Sim de Clavel.

Durante este ciclo, la menor tasa de pérdida correspondió a la variedad Marfil (0), significativamente diferente a los valores presentados por las demás variedades. Mientras que la variedad Orange Bri presentó la mayor tasa de pérdida con un porcentaje del 35% (Gráfico 20).

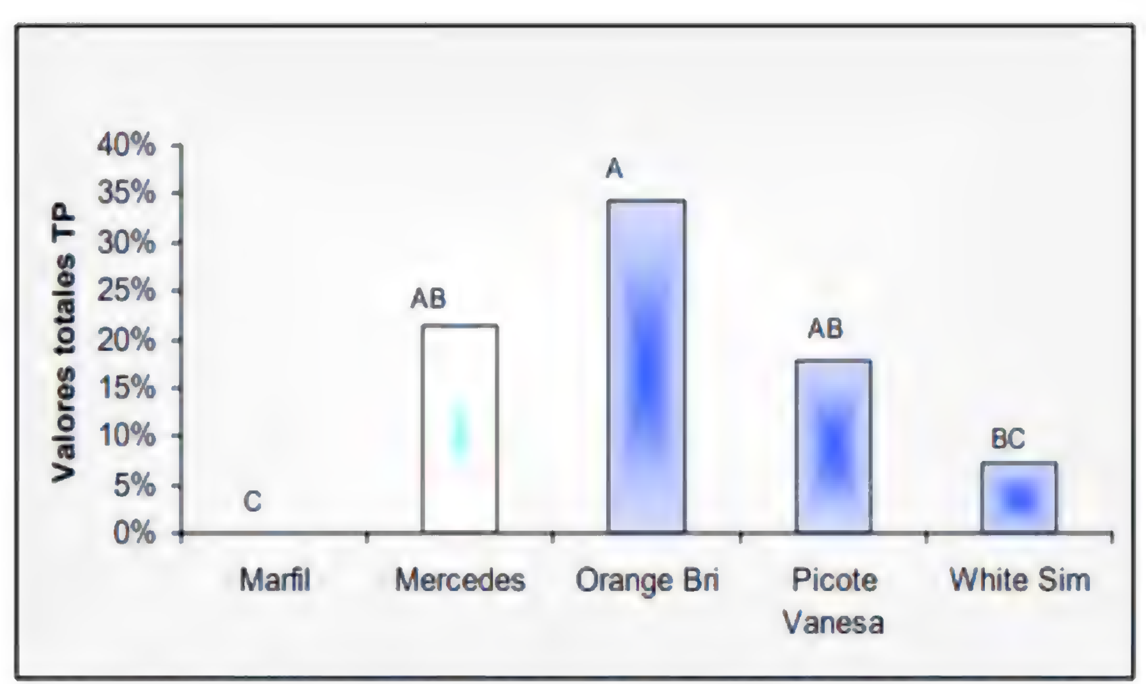


Gráfico N° 20. Valores totales de la Tasa de Pérdida (TP) en el ciclo de multiplicación 1 de las 5 variedades de Dianthus caryophyllus.

CICLO DE MULTIPLICACIÓN 2

En el segundo ciclo de multiplicación, la variedad White Sim sigue presentando la mayor tasa de velocidad de multiplicación (1.49 explantes/día). La respuesta más b aja la obtuvo Mercedes con un valor de 0.68 explantes/día (Gráfico 21).

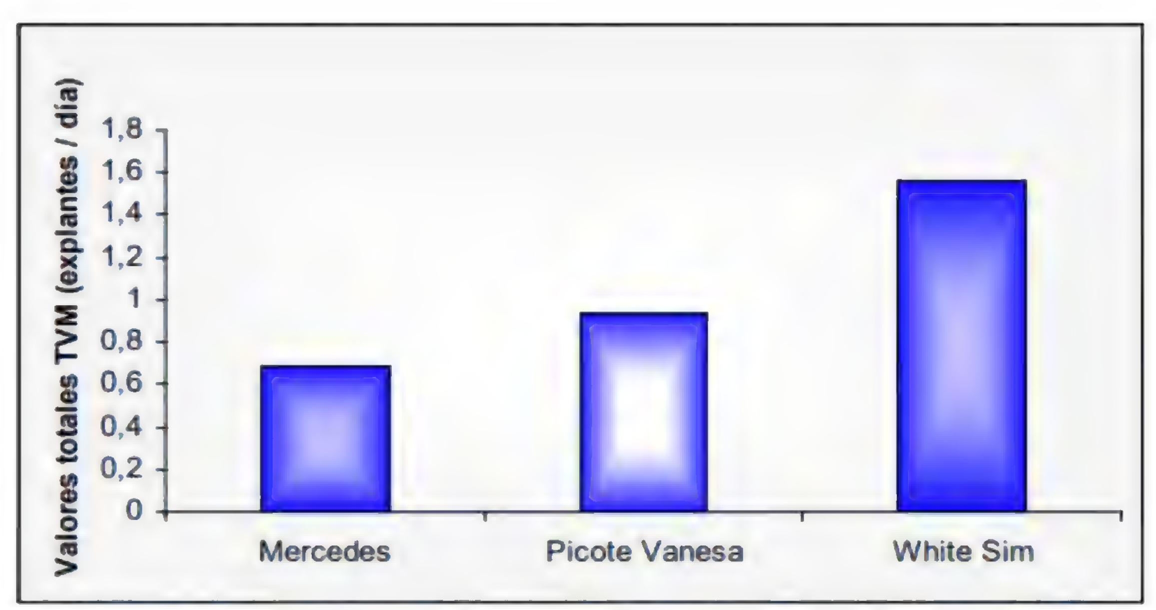


Gráfico N°21. Tasa de velocidad de multiplicación en el ciclo de propagación 2 para las variedades Mercedes, Picote Vanesa y White Sim.

En el ciclo de multiplicación 2 se presentaron diferencias estadísticas para la tasa de pérdida entre las variedades. Las variedades Marfil y Orange Bri obtuvieron valores de 86.4 y 88 % respectivamente siendo significativamente diferentes a las variedades Mercedes (27.3 %), White Sim (13.7 %) y Picote Vanesa (13.5 %) a su vez esta variedad presentó la tasa más baja, pero esta no difiere estadísticamente de White Sim. En el gráfico 22, se describe el comportamiento de cada una de las variedades con relación a la tasa de pérdida.

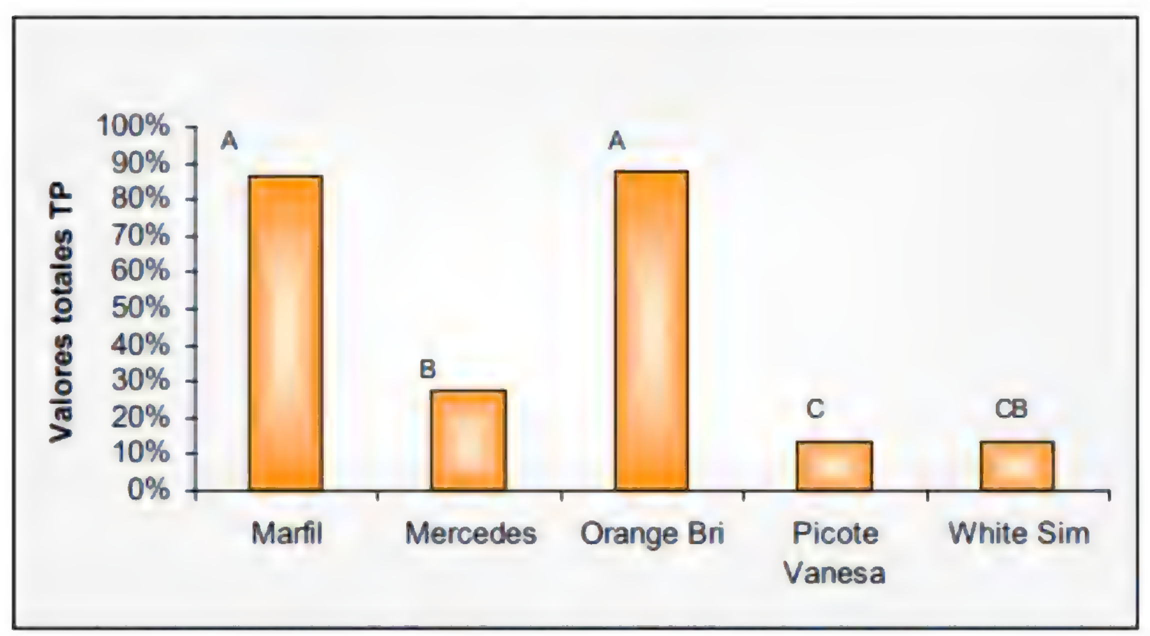


Gráfico N° 22. Valores totales de la Tasa de Pérdida (TP) en el ciclo de propagación 2 de las 5 variedades de Dianthus caryophyllus.

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGAR EN LA HIPERHIDRATACIÓN

Los datos presentados en el gráfico 23 indican el porcentaje de brotes hiperhidratados y no hiperhidratados de cada variedad respecto al tratamiento utilizado. El porcentaje de brotes hiperhidratados disminuyó con el aumento de la concentración de agar. Las variedades Mercedes y White Sim presentaron un comportamiento similar entre sí, en las 2 variedades los porcentajes más altos de brotes hiperhidratados se obtuvieron en el control (7 % de agar) (89.2 y 83.3 % respectivamente) mientras que los porcentajes más altos de brotes no

hiperhidratados ocurrieron en el tratamiento 1 (8 % de agar). Sin embargo, el porcentaje de brotes hiperhidratados y no hiperhidratados de la variedad Picote Vanesa fue similar en el control y en el tratamiento 1.

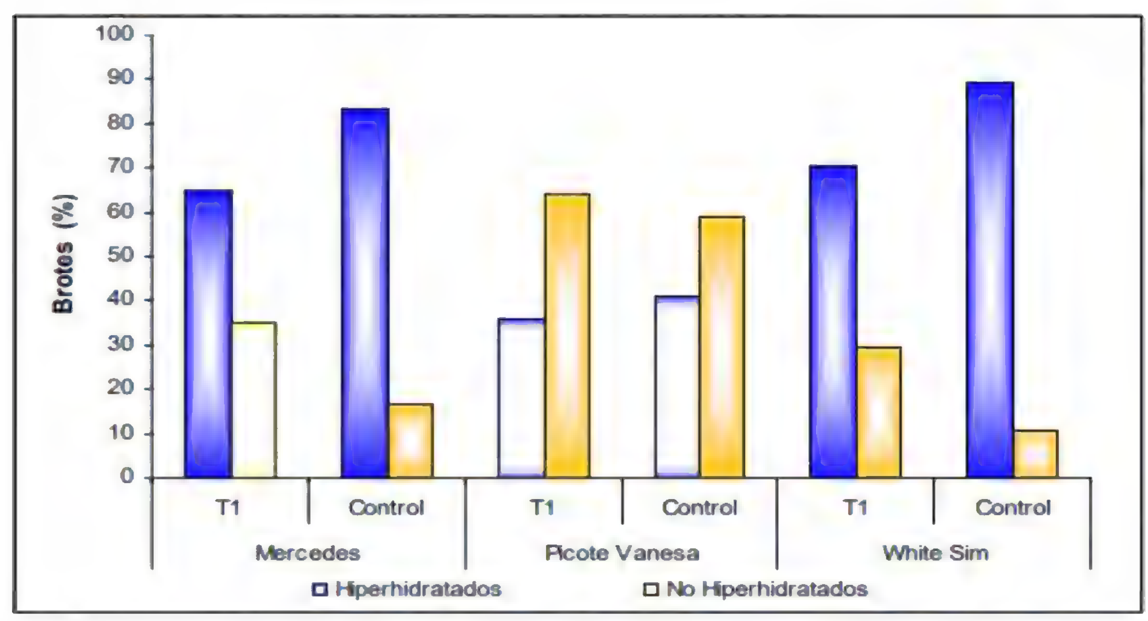


Gráfico N° 23. Efecto de la concentración de agar sobre la hiperhidratación de los explantes de las variedades Mercedes, Picote Vanesa y White Sim durante la etapa de multiplicación. T1: 8 % de agar; Control: 7 % de agar.

FASE DE ENRAIZAMIENTO IN VITRO

En el control (MS – sin reguladores de crecimiento) la variedad White Sim presentó el mayor porcentaje de brotes que desarrollaron raíces (64.3%), al igual que con el tratamiento 1 (MS/2 – sin reguladores de crecimiento) (61.5 %). Mientras que con el tratamiento 2 (MS/2 – 1 ppm de AIA) el mayor porcentaje de brotes que desarrollaron raíces lo obtuvo la variedad Picote Vanesa con un valor de 81.8 %. Este fue el valor más alto de todos los tratamientos y variedades (Gráfico 24).

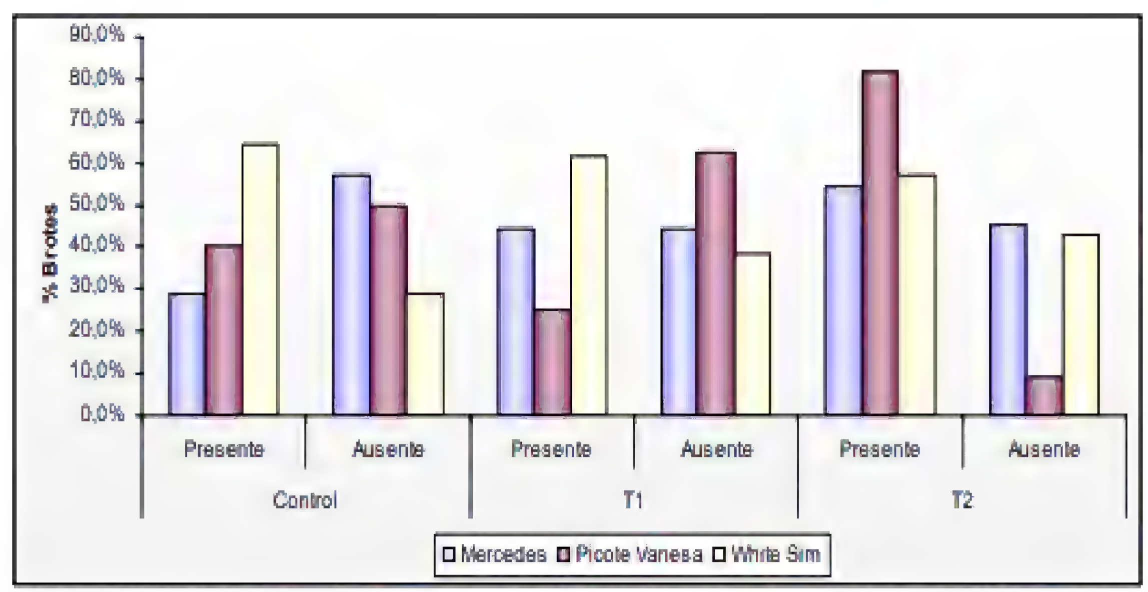


Gráfico N° 24. Efecto de la concentración del medio de cultivo y del AIA sobre el desarrollo de raíces (%) en las variedades: Mercedes, Picote Vanesa y White Sim.

Estos resultados muestran que la respuesta al tratamiento depende de la variedad. El porcentaje más alto en el desarrollo de raíces por variedad difirió en los tratamientos evaluados. Las variedades Mercedes y Picote Vanesa presentaron los porcentajes más altos en el desarrollo de raíces en el tratamiento de MS/2 con 1 ppm de ácido indolacético (AIA) (54.5 y 81.8 %, respectivamente) (Gráfico 24). Oliver – Ortega et al., (2000) reportan que en el enraizamiento in vitro, se ha observado que la iniciación de raíz y la posibilidad de enraizamiento pueden aumentar de manera significativa al disminuir los niveles de sales minerales en el medio nutritivo, lo cual mejora el enraizamiento y la aclimatación en invernadero. La concentración de AIA también influyó en los resultados, Toro (2004) reporta un 70,8 % en la formación de raíces en Prunus avium; sin embargo, el desarrollo de la relación raíz – parte área, fue muy bajo repercutiendo en la aclimatación del material.

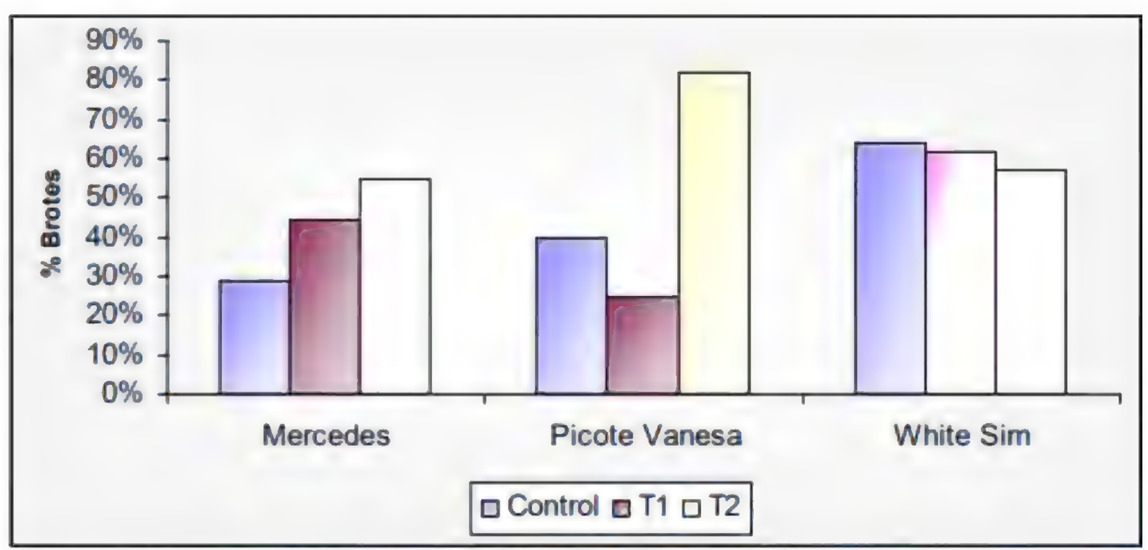


Gráfico N° 24. Comparación del efecto de los tratamientos aplicados para la inducción de raíces in vitro para cada variedad.

COMPORTAMIENTO DE LAS VARIEDADES A TRAVÉS DEL TIEMPO

Al analizar el comportamiento entre variedades durante las fases se observa que la tasa de pérdida para Mercedes, Picote Vanesa y White Sim es similar. Durante la primera fase del establecimiento (T1), se encuentran los mayores valores en un rango de 49.3 a 68.4 %. En el segundo registro del establecimiento (T2) decrecen los valores drásticamente con relación al tiempo 1 (9.8 a 17.6 %). Exceptuando la variedad Marfil ya que en esta se observa un aumento del 17 % respecto al tiempo 1. En la siguiente fase que incluye el ciclo de multiplicación 1 (T3) y el ciclo de multiplicación 2 (T4), los valores tienden a aumentar entre un 4 y 10 % respecto al tiempo 2. Sin embargo, la variedad Orange Bri tiene un incremento de 53.8 % del tiempo 3 al tiempo 4 (Gráfico 25).

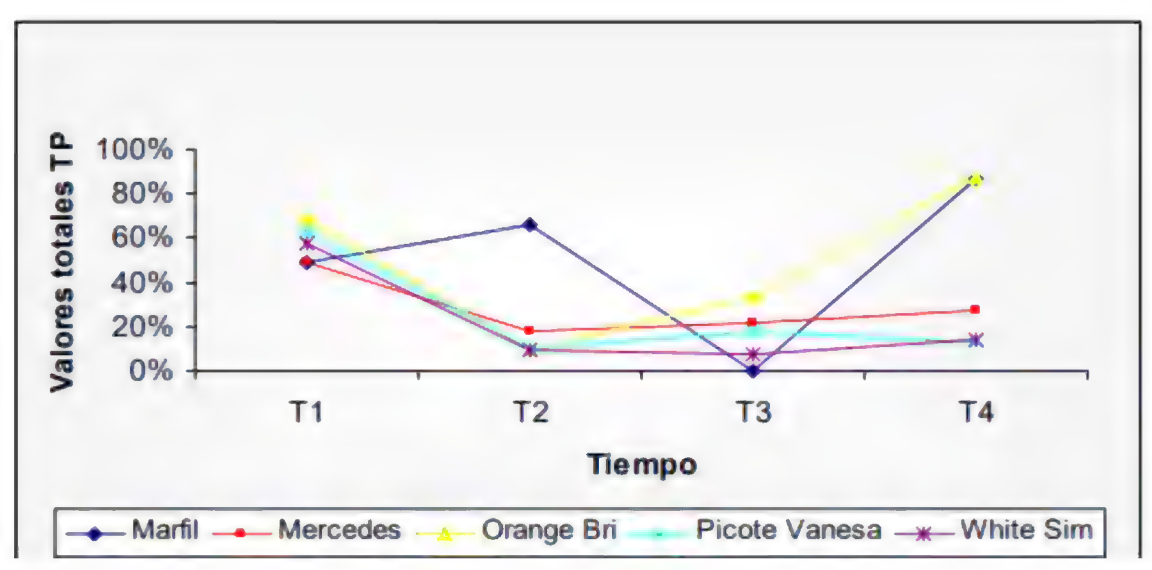


Gráfico N° 25. Tasa de pérdida en el tiempo para cada variedad

Al evaluar el comportamiento de las variedades, exceptuando la variedad Orange Bri, en los dos ciclos de multiplicación se observa una tendencia creciente respecto a la tasa de velocidad de multiplicación (Gráfico 26). Esto podría ser explicado por el aumento en la capacidad morfogénetica a través de los subcultivos (CONIF, 2005). La variedad White Sim es la que tiene la mayor tasa de multiplicación, seguida por Picote Vanesa. Sin embargo, el comportamiento de la variedad Orange Bri es totalmente opuesto, ya que tiene una tasa de velocidad de multiplicación de 22 explantes/día y termina con un valor 0.

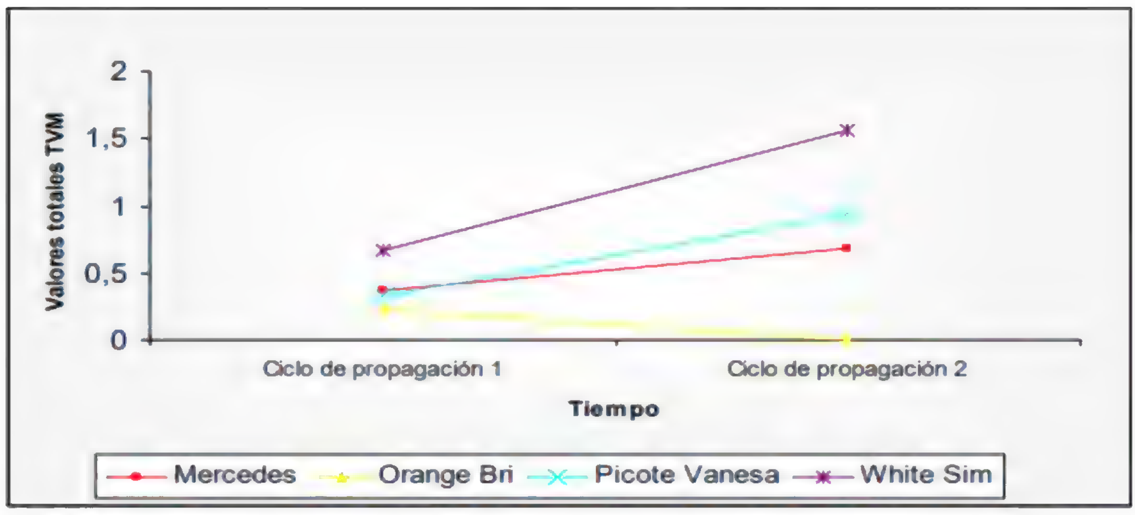


Gráfico N° 27. Tasa de velocidad de multiplicación en el ciclo de multiplicación 1 y 2 para cada variedad.

El número de brotes no hiperhidratados para cada variedad durante las diferentes fases es variable. En la Figura 28 se observa que la variedad Picote Vanesa presenta el mayor número de brotes no hiperhidratados durante todas las fases con valores entre 24 y 19. Mercedes y White Sim tienen un comportamiento similar entre sí; en el ciclo de multiplicación 2 (T4) se presenta un ligero incremento en el número de brotes no hiperhidratados para las variedades Mercedes y White Sim.

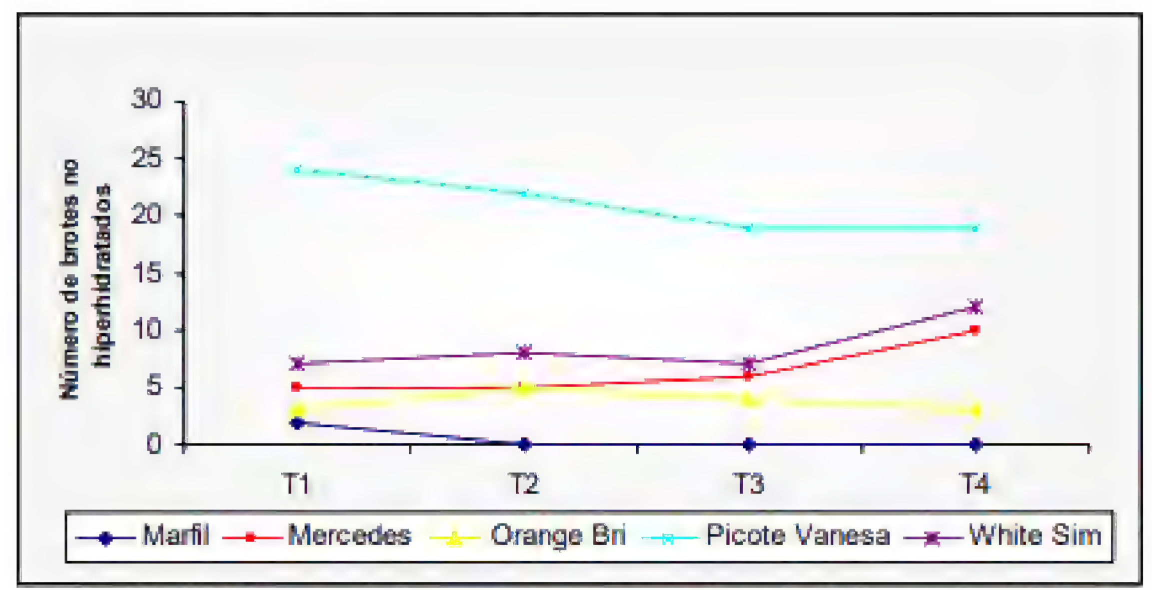


Gráfico N° 28. Número de brotes exitosos en cada variedad a través del tiempo

Como se describió anteriormente, la hiperhidratación es un desorden fisiológico común en las plantas de clavel cultivadas en condiciones in vitro. En las variedades de estudio se presentó este fenómeno desde la primera fase. Los signos iniciales se manifestaron durante las primeras semanas e incrementaron a lo largo del cultivo. Inicialmente se presentó en las hojas que estaban en contacto con el medio. Las hojas se caracterizaron por presentar una apariencia frágil y translúcida, en algunos casos se presentaba oxidación en las puntas de los tejidos.

En el gráfico 29, se presenta el número de brotes hiperhidratados por variedad durante las fases del proceso de micropropagación, las cuales mostraron un comportamiento similar. Inicialmente el número de brotes vitrificados fue mayor, pero con el tiempo disminuyó. Las variedades Mercedes y White Sim obtuvieron los resultados más altos iniciando con 63 y 54 hasta 22 y 32 respectivamente. En las variedades restantes los valores fueron similares se encontraron en un rango inicial de 36 a 26 y finalizaron con un rango de 13 a 3.

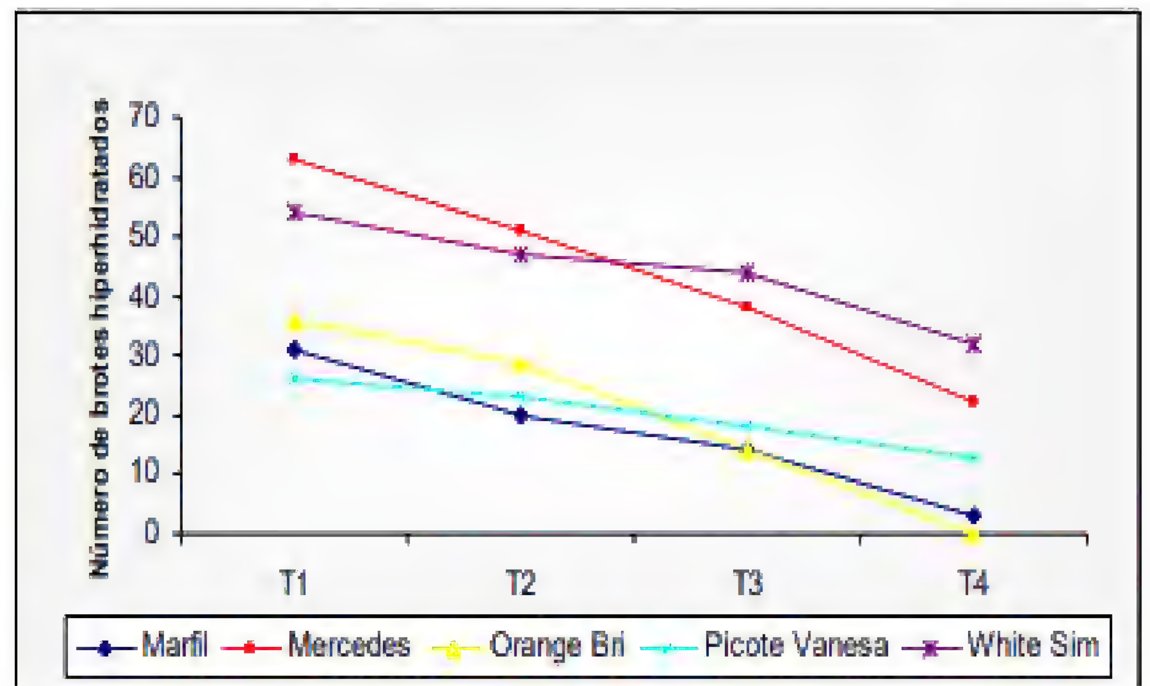


Gráfico N° 29. Número de brotes hiperhidratados por variedad a través del tiempo.

4.4.3. TABLA 5, ANEXO 3

a) Medios de cultivo

- Medio de iniciación

Este medio se preparó empleando las sales de Murashig-Skoog, 1962 (cuadro Nº 1) y completado con tiamina, piridoxina, Ac. Pantoténico, glicina en un pH de 5,7 (cuadro Nº 2).

- Medios de propagación

Estos medios tuvieron los mismos componentes del medio de iniciación, con la diferencia que estos llevan los reguladores de crecimiento (fitohormonas) al 6-Bencylaminopurina y Acido Indolacético en las concentraciones de 1,0:0,5; 2,0:1,0; 3,0:1,5 de BAP: AIA (cuadro Nº 2).

Cuadro N° 2. Composición química del medio de iniciación y los medios de propagación de yemas de *Dianthus caryophyllus* L. "clavel".

Constituyentes químicos	**M.C.I. mg/L.**	**MC-P mg/L.**		
		A	**B**	**C**
- Compuestos inorgánicos:				
Sales de M. S.	Completo	Completo	Completo	Completo
- Compuestos orgánicos:				
Tiamina-HCl	0,4	0,4	0,4	0,4
Piridoxin-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	0,5	0,5	0,5	0,5
Acido nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5
6-Bencylaminopurina	-	1,0	2,0	0,3
Ac. Indolacético	-	0,5	1,0	1,5
Sacarosa	3%	3%	3%	3%
- Otros compuestos:				
Agar	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%

b) Análisis

Las observaciones de evolución se realizan cada tres días para determinar el tiempo en que se aprecia la generación de brotes en las yemas. A los 55 y 60 días se pudo visualizar con claridad el desarrollo de un gran número de brotes que alcanzan una altura promedio de 1 cm. al promediar los 75 días los brotes tienen altura promedio de 2 cm. A partir de este tiempo se aprecia que los brotes comienzan a enraizar en el medio de propagación. El crecimiento de los brotes generados se ha producido en los tres medios empleados en el presente trabajo de investigación. Al realizar el conteo de los brotes logrados en cada medio de

propagación se determinó que el medio "C" que contiene 3,0 mg/L de BAP y 15 mg/L de AIA, tiene un mayor efecto en la formación de brotes en las condiciones de incubación realizada, con un promedio de 21,0 brotes por yema seguido del medio "B" con un promedio de 13,0 brotes por yema y el medio "A" con un promedio de 08 brotes por medio. (cuadro Nº 3).

Cuadro Nº 3. Brotes obtenidos por yema de *Dianthus caryophyllus* L. "clavel" en los medios de propagación "A", "B" y "C".

Repeticiones	Yemas Sembradas	MC-I (sobreviven)	MC-P "A"	MC-P "B"	MC-P "C"
1	50	48	10	15	20
2	50	49	6	12	24
3	-	46	9	11	18
	X	48	8	12,6	20,6

X= Representa el promedio de brotes de tres repeticiones obtenidos en cada yema sembrada en cada uno de los medios de propagación.

4.4.4. TABLA 5, ANEXO 4.

a) Medio de cultivo

El medio elegido para la introducción y desarrollo del material vegetal de clavel fue el medio basal de Murashige y Skoog, (1962) según lo recomendado por Hurtado, (1994). Para ello se preparó en un inicio soluciones stock donde los nutrientes están disueltos en altas concentraciones. Estos son:

- La solución A, en la cual están disueltas los macronutrientes.
- La solución B, en la que están disueltas los micronutrientes.
- En la solución C los compuestos de hierro.
- La solución D, compuesta por mio-inositol.
- La solución E, compuesta por las vitaminas.

- Los reguladores de crecimiento se prepararon por separado.

Cuadro N° 4. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog, (1962) para el cultivo de clavel según Hurtado y Merino, (1994) suplementado con algunos reguladores de crecimiento.

Macronutrientes (mg.L⁻¹)		Micronutrientes (mg. L⁻¹)		Vitaminas (mg. L⁻¹)	
NO_3NH_4	= 825,0	BO_3H_3	= 3,100	Myo-inositol	= 100,0
NO_3K	= 950,0	$SO_4Mn\ 4\ H_20$	= 11,100	Tiamina-ClH	= 0,1
$SO_4Mg\ 7H_2O$	= 185,0	$SO_4Zn\ 4\ H_20$	= 4,300	Piridoxina-ClH	= 0,5
PO_4H_2K	= 85,0	$MoO_4Na_2\ 2\ H_20$	= 0,125	Ac. Nicotínico	= 0,5
$Cl_2Ca.2H_2O$	= 220,0	$SO_4Cu\ 5H_20$	= 0,0125	Glicina	= 2,0
EDTA Na_2	= 18,6	$Cl_2Co\ 6\ H_20$	= 0,0125		
$SO_4Fe\ 7H_2O$	= 13,9	IK	= 0,410		

Fuente: Hurtado y Merino (1994)

b) Análisis

- Establecimiento de meristemos a condiciones in vitro

PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA

En el gráfico 30, se presentan los resultados obtenidos del porcentaje de supervivencia de meristemos de clavel, al establecimiento in vitro.

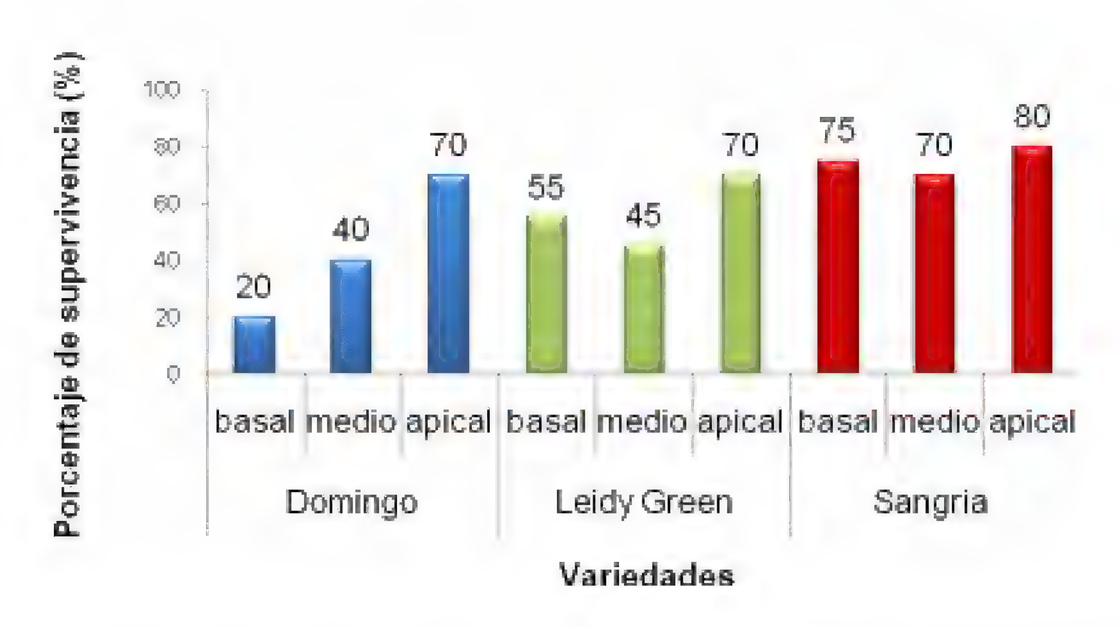


Gráfico N° 30. Porcentaje de supervivencia de tres tipos de explantes meristemáticos de clavel (explante basal, medio y apical)

Como se observa en la figura 5, la variedad Sangría, tuvo mayor porcentaje de supervivencia (73,33%) respecto a las variedades Leidy Green y Domingo registrando el menor porcentaje de supervivencia de 43,33%.

Por otra parte, el porcentaje de supervivencia según la posición del meristemo tuvo un valor máximo de 73,33% para los meristemos apicales, mientras que la posión basal registró menores plantas vivas a la cuarta semana del establecimiento (50%)

La diferencia observada puede atribuirse a la variedad, a la viabilidad, al tamaño del explante (2mm), al medio de cultivo, al manipuleo del explante y a la capacidad de regeneración de la misma. De acuerdo al tipo de explante según la posición de la yema extraída, las yemas apicales tienen mayor capacidad de regeneración respecto a las yemas laterales. A menor tamaño de explante más efectivo es el procedimiento para eliminar organismos patógenos, por otra parte, entre más pequeña sea el explante el manejo resulta más difícil y menor la tasa de supervivencia.

PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN

El porcentaje total de contaminación por hongos y bacterias, encontrado en el presente trabajo fue de 13,33%, de los cuales 9,44% fueron causados por bacterias y 3,88% por hongos como se puede observar en el gráfico 31.



Gráfico N°31. Porcentaje de contaminación por hongos y bacterias en las tres variedades de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría) estudiadas durante el establecimiento in vitro.

Se obtuvo una baja contaminación debido a que se tuvo un especial cuidado en la limpieza de los ambientes de trabajo, así como también se eliminó los organismos patógenos presentes en el explante lavando cuidadosamente el material vegetal antes de introducir a la cámara de flujo laminar.

c) CRECIMIENTO DEL MERISTEMO AL TÉRMINO DE UN MES

Considerando, la posición de la yema que se ha extraído del vástago (apical, medio y basal). Se evaluaron las variables altura de vitroplanta, diámetro de tallo y el número de hoja por vitroplanta, durante el crecimiento. De estos mostraron un mejor desarrollo las partes apicales respecto a las partes basal y media.

CUADRO N° 5. Comparación de medias del desarrollo en cuanto a la altura, diámetro de tallo y el número de hojas de tres tipos de explantes (Basal, Medio ***y Apical). Se muestran los valores de las medias ± la desviación.***

Variedad	Tipo de explante	Altura (mm)	Diámetro (mm)	Número de hojas
Domingo	Basal	3,95 ± 7,51	0,95 ± 1,17	1,75 ± 3,35
	Medio	7,35 ± 10.05	1,30 ± 1.75	3,45 ± 4.61
	Apical	16,10 ± 14.23	2,70 ± 1.92	5,65 ± 5.48
Leidy Green	Basal	14,90 ± 14.68	2,45 ± 1.87	7,80 ± 5.54
	Medio	9,85 ± 10.32	2,20 ± 2.06	5,45 ± 5.83
	Apical	16,80 ± 12.70	2,80 ± 1.61	8,35 ± 5.32
Sangría	Basal	13,10 ± 7.03	2,40 ± 1.35	6,70 ± 4.18
	Medio	13,50 ± 7.14	2,60 ± 1.42	8,70 ± 4.24
	Apical	19,70 ± 12.66	2,65 ± 1.53	9,40 ± 5.25

Altura de vitroplanta

La comparación de medias según el tipo de explante en las tres variedades de clavel, aplicando la prueba de Duncan (5%), muestra la existencia de 6 grupos diferentes, estadísticamente significativas para la variable altura de vitroplanta. En el T4 el meristemo apical de la variedad Sangría fue el que tuvo mayor altura (19,7 mm), a esto le sigue el T7 variedad Leidy Green con el explante apical. Por lo tanto, el tratamiento (Explante Apical) es el mejore meristemo para obtener mayor desarrollo en altura de la vitroplanta para el establecimiento en condiciones in vitro. Asimismo, se observa otro grupo estadísticamente iguales que son el T3 (Domingo explante apical), T5 (Sangría explante medio), T6 (Sangría explantes basal) y T9 (Leidy Green explantes basal). Seguido de los tratamientos T2 y T8 Sangría y Leidy Green en el explante medio.



Letras distintas difieren estadísticamente para p< 0,05 según la prueba de Duncan

Gráfico N° 32. Crecimiento de tres tipos de explantes meristemáticos para la variable altura de vitroplanta en tres variedades de clavel. A la cuarta semana de evaluación.

Con el valor más bajo se tiene el T1 (Domingo explante basal) con 3,5 mm de altura de vitroplanta. (Gráfico 32), siendo este último tratamiento (Explante Basal) el peor explante meristemático para obtener mayor desarrollo en altura de la vitroplanta en la fase de establecimiento.

Diámetro de la vitroplanta

Mediante la prueba de Duncan (5%) (figura 8) se reconoce cuatro grupos. Se obtuvo mayor grosor de diámetro en el explante apical con 2,8 mm (T9), 2,7 mm(T3) y 2,65 mm (T6) en las tres variedades Leidy Green, Domingo y Sangría respectivamente. Dentro de este mismo grupo esta T4 explante basal y T5 explante medio en la variedad Sangría, además del T7 el tipo de explante basal variedades Leidy Green. Estos tratamientos (explante apical y Medio) son los mejores explantes meristemáticos para obtener mayor diámetro de vitroplanta en el establecimiento in vitro de clavel, seguido de los tratamientos T8, T2 Y T1, en donde la variedad Domingo explante Basal, obtuvo el menor diámetro de

vitroplanta (0,95 mm), siendo el explante Basal el menos adecuado para obtener mayor diámetro de vitroplanta en el establecimiento in vitro.



Letras distintas difieren estadísticamente para p< 0.05 según la prueba de Duncan

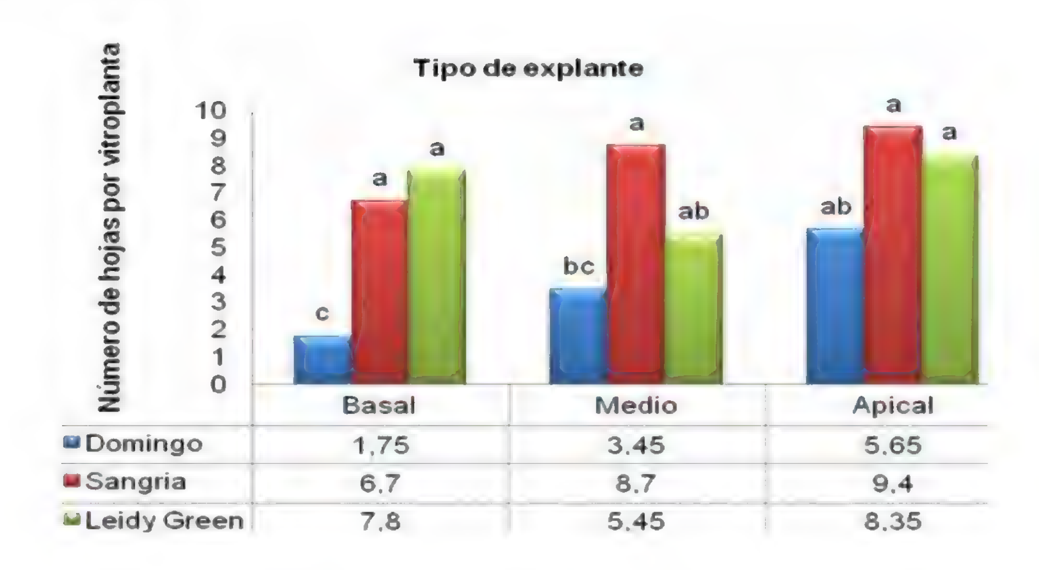
Gráfico N° 33. Promedio de diámetro (mm) en tres variedades de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría) para tres diferentes tipos de explantes meristemáticos a la cuarta semana de crecimiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar que el tipo de explante no influye en el grosor del tallo de la vitroplanta solo se observa diferencias entre las variedades esto debido a que cada variedad tiene diferente grosor de tallo según su morfología y por lo tanto tendrá un comportamiento en función de la morfología de la especie.

Número de hojas de la vitroplanta

Como se puede observar en el gráfico 34, mediante la prueba de Duncan (5%) se separan cuatro grupos distintos, donde se detectaron diferencias estadísticas para la combinación variedad por tipo de explante. El tratamiento que presentó mayor número de hojas (9,4 hojas /vitroplanta) fue el T6 (Sangría en explante apical), dentro del mismo grupo se encuentran los tratamientos T5 (Sangría en explante medio), T7 (Leidy Green en explante basal) y el T9 (explante apical en Leidy Green), estando el explante apical y medio como los mejores explantes

meristemáticos para obtener mayor número de hojas en la fase de establecimiento. Con un promedio intermedio está el T8 (variedad Leidy Green en explante medio) con 5,45 hojas y el T3 (Domingo en explante apical) con 5.65 hojas. Seguido del T2 (Domingo en explante medio) con 3.45 hojas. Por último, con el promedio más bajo esta el T1 (variedad Domingo en explante basal) con 1,75 hojas por vitroplanta, siendo este tratamiento (explante basal) el menos adecuado para obtener mayor número de hojas por vitroplanta en la fase de establecimiento.



Letras distintas difieren estadísticamente para p< 0,05 según la prueba de Duncan

Gráfico N° 34. Comportamiento del número de hojas de la vitroplanta en tres variedades de clavel sobre los tipos de explantes meristemáticos. A la cuarta semana de crecimiento

En el cuadro 6, se puede observar el análisis de varianza de la fase de establecimiento para las variables de estudio altura, diámetro y número de hojas en el desarrollo de la planta.

Cuadro N°6. Análisis de varianza para la variable altura, diámetro y número de hojas en el desarrollo de la vitroplanta.

Variable	Fuente de variación	Grado de libertad	Cuadrado medio	F c	Sig.
Altura	Variedad	2	644,43	5,24	0,006 *
	Tipo de explante	2	1008,43	8,20	0,000 *
	Tipo ex. X Variedad.	4	154,64	1,26	0.288 NS
Diámetro	Variedad	2	15,08	5,17	0,007 *
	Tipo de explante	2	7,40	2,53	0,087 NS
	Tipo ex. X Variedad.	4	5,95	2,04	0.091 NS
Número de hojas	Variedad	2	356,00	14,64	0,000 *
	Tipo de explante	2	16,10	0,66	0.51 NS
	Tipo explante X Variedad.	4	73,53	3,02	0,019 *

** = Altamente significativo   * = significativo   **NS** = No significativo

Mediante el análisis de varianza (ANVA), se observó diferencias significativas, como resultado del factor variedad para las variables de estudio altura, diámetro y número hojas; pero en cuanto al tipo de explante es significativo solo para la variable altura de vitroplanta y es no significativo en la variable diámetro y número de hojas en el desarrollo de la vitroplanta. Según el análisis estadístico se puede afirmar que la interacción entre el tipo de explante y la variedad son no significativos como se observa en el cuadro 9 siendo que el tipo de explante no depende de la variedad de clavel en las variables de estudio altura y diámetro. En cambio, en la variable de estudio número de hojas es significativo donde el tipo de explante depende de la variedad.

d) MULTIPLICACIÓN

En el cuadro 7, se aprecian los promedios del desarrollo en cuanto a crecimiento en altura, número hojas, brotes, hojas cloróticas y el grado de enraizamiento en tres diferentes medios de cultivo, obteniéndose como el mejor medio de cultivo el M2 en el cual la variedad Sangría obtuvo 26,55mm de altura, 5,60 brotes en la variedad Leidy Green, 10,85 hojas y 0,40 de grado de enraizamiento en la variedad Sangría con el M1 y ninguna hoja clorótica con el medio de cultivo M3 en la variedad Domingo en forma general

Cuadro N° 7. Comportamiento de la altura, número de brotes, de hojas, hojas cloróticas y el grado de enraizamiento a diferentes medios de cultivo en tres variedades de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría).Se muestran los valores de las medias ± la desviación estándar.

Variedad	Medio	Altura (mm)	Número de brotes	Número de hojas	Número h. cloróticas	Grado enraizam.
Domingo	1	13,70 ± 4.29	2,90 ± 1.21	6,50 ± 1.00	2,00 ± 1.25	0,25 ± 0.64
	2	14,55 ± 3.07	4,20 ± 1.88	8,70 ± 1.03	0,35 ± 0.59	0,10 ± 0.30
	3	13,65 ± 2.25	2,30 ± 0.97	7,85 ± 1.46	0,00 ± 0.0	0,10 ± 0.30
Leidy Green	1	19,50 ± 10.9	3,15 ± 1.66	7,40 ± 3.20	2,25 ± 2.24	1,10 ± 1.16
	2	21,00 ± 7.88	5,60 ± 2.56	9,60 ± 2.01	0,70 ± 1.17	0,25 ± 0.44
	3	18,90 ± 2.71	2,55 ± 0.94	9,00 ± 1.71	0,35 ± 0.98	0,00 ± 0.0
Sangría	1	26,55 ± 15.4	3,40 ± 2.37	10,85 ± 5.5	1,35 ± 1.78	0,40 ± 0.82
	2	16,15 ± 7.57	5,05 ± 3.54	9,10 ± 3.07	1,55 ± 2.13	0,00 ± 0.0
	3	17,45 ± 7.27	2,05 ± 0.99	7,70 ± 1.83	0,10 ± 0.30	0,15 ± 0.36

Altura de la vitroplanta

Como se observa en el gráfico 35 y mediante la prueba de Duncan (5%), se evidencia que el mejor tratamiento respecto al desarrollo en altura de vitroplanta se tiene al T5 (Sangría X M2) el medio de cultivo 2 (MS + 2 ppm BAP y 0,10 ppm AIA) obteniéndose una altura de 26,55 mm, esta es la mejor combinación de reguladores de crecimiento para obtener mayor altura de vitroplanta en el cultivo de meristemos de clavel.

Como otro grupo estadísticamente diferente está el T8 (Leidy Green X M2) el mismo que registró 21,00 mm de altura, en el medio de cultivo 2 (2 ppm BAP + 0,10 ppm AIA) es una relación de reguladores de crecimiento auxina y citocininas aceptables para el desarrollo de la vitroplanta en cultivo de meristemos. Posteriormente como otro grupo estadísticamente iguales, pero con valores algo bajos están los tratamientos: T4 (Leidy Green X M1), T9 (Leidy Green X M3) y el T6 (Sangría X M3). Un desarrollo mediano en altura de vitroplanta, esto se debe a la utilización de BAP, AIA e IBA como regulador de crecimiento en el medio de cultivo. Como un último grupo con valores un más bajos, se tiene al T1 (Domingo X M1), T3 (Domingo X M3) y T2 (Domingo X M2). Esto permite afirmar que estas combinaciones son las menos adecuada para obtener mayor altura de vitroplantas en cultivo de meristemos de clavel, también se observa que cada variedad responde de diferente forma a determinadas hormonas de crecimiento.



Letras iguales no son estadísticamente diferentes

Gráfico N°35. Efecto del medio de cultivo 1(0,30 ppm AIA), 2 (2 ppm BAP + 0,10 ppm AIA) y 3 (2 ppm BAP + 0,50 ppm IBA) sobre el crecimiento en altura de las vitroplantas de clavel

Número de brotes

En el gráfico 36, realizado la prueba de Duncan (5%) se observa que el mayor número de brotes se obtuvo en el T8 (Leidy Green X M2) 5,6 brotes, T5 (Sangría X M2) 5,05 brotes y el T2 (Domingo X M2) 4,20 brotes estos tratamientos son estadísticamente iguales, con el medio cultivo 2 (2 ppm BAP y 0,10 ppm AIA) este es el medio más adecuado para obtener mayor número de brotes por meristemos. Con valores intermedios se tiene al medio de cultivo 1 (MS + 0,30 ppm AIA) para las tres variedades de clavel las mismas son estadísticamente iguales, que son el T1 (Domingo X M1), T4 (Sangría X M1) y T7 (Leidy Green X M1) donde se observa que dentro de las variedades no existe diferencias, esto debido a que la variedad no influye en el comportamiento del medio de cultivo utilizado. Los valores más bajos se obtuvieron con el medio 3 (MS + 2 ppm BAP y 0,5 ppm IBA) con 2,3, 2,5 y 2,05 brotes en el T3 (Domingo X M3), T6 (Sangría X M3) y T9 (Leidy Green X M3) respectivamente, estos tratamientos son los

menos adecuados para obtener mayor número de brotes por meristemo. Esto permite afirmar que el AIA complementado con BAP tiene efecto importante para obtener mayor número de brotes por vitroplanta en el cultivo in vitro de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría) y no así la relación de BAP con el AIA.

Se puede afirmar que el medio de cultivo 2 tiene la mejor combinación de reguladores de crecimiento para incrementar el número de brotes en vitroplantas de clavel.



Letras iguales no son estadísticamente diferentes

Gráfico N° 36. Desarrollo del número de brotes en la vitroplanta sobre tres variedades de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría) en diferentes medios de cultivo a la cuarta semana de evaluación.

Número de hojas de la vitroplanta

La prueba de Duncan (5%) para esta variable de estudio determinó 3 grupos estadísticamente diferentes. El mejor tratamiento fue el T5 (Sangría X M2) obtuvo 10,85 hojas por vitroplanta. En la fase de multiplicación los tratamientos con mayor promedio de hojas fueron los T4 (Sangría X M1), T8 (Leidy Green X M3) y T9 (Leidy Green X M3), siendo estos tratamientos con el medio 2 y 3 como los mejores medios para obtener mayor número hojas por vitroplanta en la multiplicación. Dentro los valores intermedios está el T2 (Domingo X M2), T3

(Domingo X M3) y T9 (Sangría X M). El valor más bajo corresponde al T1 (Domingo X M) con 6,5 hojas y el T 7 (Leidy Green X M3) con 7,4 hojas, siendo así el medio de cultivo 1 (MS + 0,3 ppm AIA) el peor medio para la obtención de hojas por vitroplanta, como se puede observar en el gráfico 37.



	M1	M2	M3
Domingo	6.5	8.7	7.85
Sangria	9.1	10.85	7.7
Leidy Green	7.4	9.6	9

Letras iguales no son estadísticamente diferentes

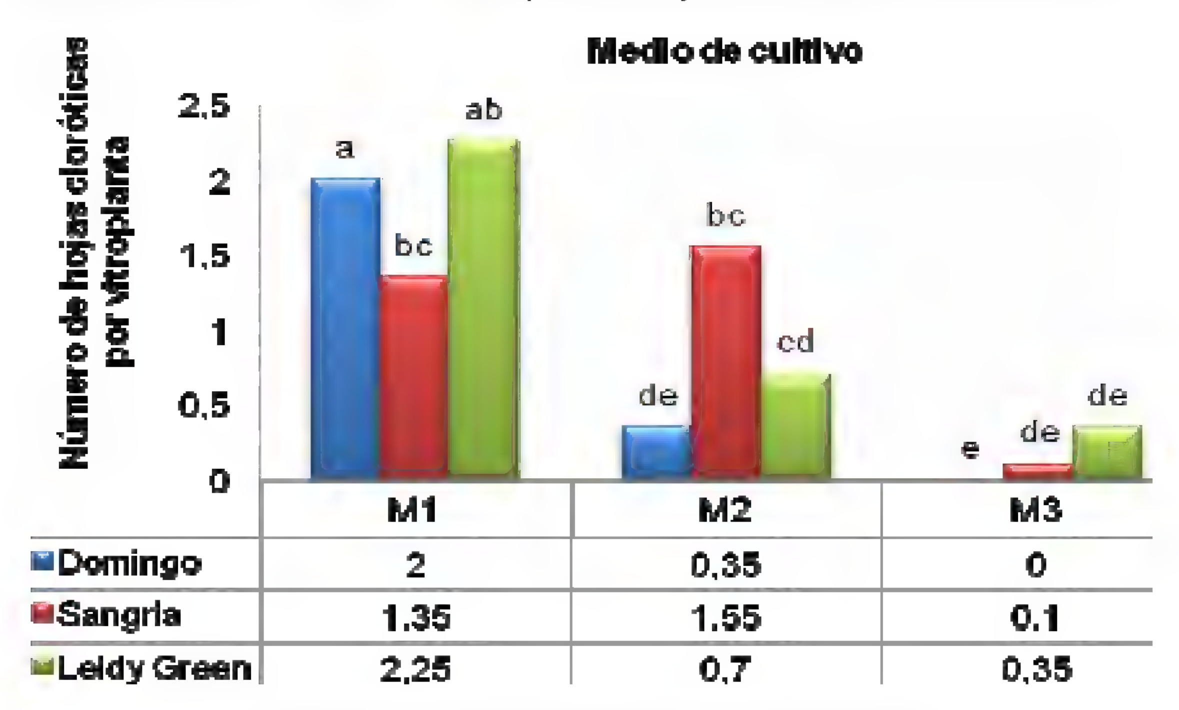
Gráfico N°37. Desarrollo del número de hojas por vitroplanta en tres variedades de clavel Domingo, Leidy Green y Sangría en diferentes medios de cultivo.

Un factor que ayudo a obtener mayor número de hojas por vitroplanta es el medio de cultivo con reguladores de crecimiento auxinas y citocininas como sucede para el medio 2 y 3 que se obtuvo mayor cantidad de hojas respecto al medio de cultivo 1 que solo tiene como regulador de crecimiento a la auxina.

Número de hojas cloróticas en las vitroplantas de estudio

Mediante la prueba de Duncan (5%) se observó diferencias significativas para la variable de estudio número de hojas cloróticas en el gráfico 38. Se observa los valores más bajos en el medio de cultivo 3 (MS + 2 ppm BAP y 0,5 ppm IBA) del T3 (Domingo X M3) con cero hojas cloróticas como el mejor tratamiento, por otro lado, está el segundo grupo estadístico el T6 (Sangría X M3), el T9 (Leidy Green X M3) y T2 (Domingo X M2) con un promedió inferior pero aun acéptale para

disminuir el número de brotes en las vitroplantas de clavel. También se observó que los valores más altos corresponden al medio de cultivo 1 (MS + 0,3 ppm AIA) el T7 (Leidy Green X M1) y el T1 (Domingo X M1). Luego se tiene un grupo intermedio estadísticamente iguales entre sí como el T4, T5 y T9 los que se descartaron por presentar mayor cantidad de hojas cloróticas siendo los tratamientos con el medio 1 como que más hojas cloróticas han desarrollado.



	M1	M2	M3
Domingo	2	0,35	0
Sangria	1.35	1.55	0.1
Leidy Green	2,25	0,7	0,35

Letras iguales no son estadísticamente diferentes

Gráfico N° 38. Desarrollo del número de hojas cloróticas en la vitroplanta bajo tres variedades de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría) en diferentes medios de cultivo en la cuarta semana de evaluación.

Esto permite afirmar que el BAP suplementado con IBA tiene un efecto de importancia para la obtención de hojas cloróticas en las tres variedades de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría) resultando como el mejor tratamiento.

Grado de enraizamiento de la vitroplanta

De acuerdo a los resultados de la prueba de Duncan (5%) los resultados agrupan a los tratamientos en cuatro grupos estadísticamente diferentes como se observa en el gráfico 39, Se genera mayor número de raíces por efecto del medio de

cultivo 1 en el T 7 (Leidy Green X M1), con 1,10 de grado de enraizamiento. Un grupo intermedio se tiene al T1, T2, T8, T3 y el T6 con un grado de enraizamiento aceptable. Los valores más bajos se presentaron en el medio de cultivo 3 con el T9 y en el medio de cultivo 2 del T5 se obtuvo cero grados de enraizamiento estos son rechazados en el caso en que se desee obtener enraizamiento. Esto permite afirmar que el suplemento con 0,3 ppm de AIA en el medio MS tuvo un efecto directo en la obtención de un mayor grado de enraizamiento en las tres variedades de clavel por lo tanto la auxina AIA se puede utilizar para el enraizamiento de vitroplantas de clavel. Esto coincide con lo que obtuvo Rocha, un 100% de enraizamiento al cultivar tres variedades de clavel al utilizar como enraizador solo con auxinas.



	M1	M2	M3
Domingo	0,25	0,1	0,1
Sangria	0,4	0	0,15
Leidy Green	1,1	0,25	0

Letras iguales no son estadísticamente diferentes

Gráfico N° 39. Comportamiento del grado de enraizamiento de las vitroplantas en tres variedades de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría) en diferentes medios de cultivo. Evaluadas a la cuarta semana.

La acción de los reguladores de crecimiento tiene un efecto positivo sobre la formación de raíces en las vitroplantas de clavel, en los resultados se observa

que las auxinas promueven el desarrollo de las raíces y las citocininas inhiben el desarrollo de las raíces, es por esta razón que se obtuvó cero grado de enraizamiento en los medios de cultivo 2 y 3 que tiene mayor concentración de BAP y con el medio de cultivo 1 que solo tenía auxinas (AIA) se obtuvó el mayor grado de enraizamiento en las tres variedades de clavel.

Cuadro N°8. Análisis de varianza para la altura, número de brotes, de hojas, de hojas cloróticas y el grado de enraizamiento en el desarrollo de la vitroplanta por efecto de tres medios de cultivo.

Variables	Fuente de variación	Grado de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Altura	Variedad	2	6,79	6,48	0,00 *
	Medio de cultivo	2	0,32	0,31	0,73 NS
	Variedad X Medio cultivo.	4	2,31	2,21	0,07 NS
Número de brotes	Variedad	2	0,26	0,97	0,37 NS
	Medio de cultivo	2	7,04	25,85	0,00 *
	Variedad X Medio cultivo.	4	0,19	0,71	0,58 NS
Número de hojas	Variedad	2	0,49	1,47	0,23 NS
	Medio de cultivo	2	1,12	3,35	0,03 *
	Variedad X Medio cultivo	4	0,88	2,64	0,03 *
Número de h. Clorótica s	Variedad	2	0,83	0,18	0,83 NS
	Medio de cultivo	2	14,63	32,23	0,00 *
	Variedad X Medio cultivo.	4	1,44	3,18	0,01 *
Grado de enraizam iento	Variedad	2	0,84	4,83	0,00 *
	Medio de cultivo	2	2,18	12,48	0,00 *
	Variedad X Medio cultivo.	4	0,79	4,55	0,00 *

** = Altamente significativo ** = significativo NS = No significativo

Según el ANVA realizado la variedad es significativa para la altura, hojas, y en grado de enraizamiento. El medio de cultivo es significativo para número de brotes, hojas, hojas cloróticas y el grado de enraizamiento. La interacción es significativa en número de hojas, hojas cloróticas y el grado de enraizamieto,

donde el medio de cultivo depende de la variedad en estas variables de estudio como se observa en el cuadro 8.

e) PORCENTAJE DE PRENDIMIENTO DE LAS VITROPLANTAS

Al evaluar el comportamiento de la variable de estudio porcentaje de supervivencia en las tres variedades se observó que difieren entre ellas, obteniéndose el 90% en las variedades Domingo y Sangría y el 80% para la variedad Leidy Green. En forma general se alcanzó un 86,67% de prendimiento, esto se debió al medio de cultivo utilizado llegando a un buen porcentaje de prendimiento. En el cuadro 9, se halla el promedio del desarrollo de las vitroplantas de clavel de las variables de estudio altura, número de nudos hojas, hojas cloróticas y el grado de enraizamiento de la fase de enraizamiento en laboratorio.

Cuadro N°9. Comparación de medias del desarrollo en altura, número de nudos, hojas, hojas cloróticas y grado de enraizamiento en tres variedades de clavel. Se muestran los valores de las medias ± la desviación estándar.

Variedad	Altura	Número de nudos	Número de hojas	Número de h. cloróticas	Grado de enraizam.
Domingo	47,55 ± 9.37	5,90 ±1.42	12,62 ± 3.87	4,62 ± 3.34	0,55 ± 0.55
Leidy Green	35,20±10.47	7,02 ±2.05	16,92 ± 5.35	3,75 ± 4.49	1,12 ± 1.20
Sangría	39,55± 1.00	6,60±1.82	14,37 ± 4.14	3,85 ± 2.61	1,00 ± 1.21

f) ALTURA DE LA VITROPLANTA, NÚMERO DE NUDOS, NÚMERO DE HOJAS Y EL GRADO ENRAIZAMIENTO

Como se observa en el gráfico 40, después de realizar la prueba de Duncan (5%) se determinó que las tres variedades son estadísticamente diferentes respecto

a la altura de vitroplanta. Este comportamiento de debe a la acción directa del medio MS diluido al 50% sobre las variedades. El efecto más notable, se presentó en la variedad Domingo con 47,55 mm respecto a las variedades Leidy Green y Sangría. En el desarrollo de número de nudos una vez realizada la prueba de Duncan al (5%) se encontró diferencias significativas, en la variedad Leidy Green como el mejor tratamiento, obteniendo 7,02 nudos por vitroplanta en comparación de las variedades Sangría y Domingo. Al evaluar el número de hojas cloróticas se obtuvo 0,55 hojas cloróticas como el mejor comportamiento para la variedad Domingo respecto a las otras variedades.



	Altura de vitroplanta (mm)	N de nudos	N de hojas	N de hojas cloroticas
Domingo	47.55	5.9	12.62	4.62
Sangria	39.55	6.6	14.37	3.85
Leidy Green	35.2	7.02	16.92	3.75

Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0.01$

Gráfico N° 40. *Desarrollo de altura de vitroplanta (mm.), número de nudos, hojas y la presencia de hojas cloróticas en la fase de enraizamiento de las vitroplantas en tres variedades de clavel.*

Mediante la prueba de Duncan (5%), se evidencia que el mejor tratamiento para el variable número de hojas lo obtuvo la variedad Leidy Green con 16,92 hojas con respecto a las otras variedades.

Cuadro N° 10. Análisis de varianza para el efecto del medio MS al 50% de concentración sobre el enraizamiento de tres variedades de clavel (Domingo, Leidy Green y Sangría). En laboratorio

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grado de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Altura	20.415	2	10.207	14.665	0.00 *
Error	81.435	117	0.696		
Total	101.850	119			
Número de nudos	0.936	2	0.468	4.227	0.17 NS
Error	12.961	117	0.111		
Total	13.897	119			
Número de hojas	6.149	2	3.075	10.075	0.00 *
Error	35.704	117	0.305		
Total	41.853	119			
N. de h. cloróticas	3.691	2	1.846	1.539	0.219 NS
Error	140.315	117	1.199		
Total	144.006	119			
Grado de enraizamiento	1.214	2	0.607	1.340	0.266 NS
Error	53.002	117	0.453		
Total	54.216	119			

Mediante el análisis de varianza (ANVA), se observó diferencias significativas, el efecto del medio MS diluido al 50% en las tres variedades de clavel sobre el desarrollo de la vitroplanta en las variables altura de vitroplanta y número de hojas. De ello se pudo obtener el efecto directo que tiene el uso del medio diluido al 50% en las tres variedades de clavel y no así en las variables número de nudos y hojas cloróticas.

Porcentaje de prendimiento de las vitroplantas

En la fase de aclimatación se obtuvo un 94, 84.8 y 86.4% de prendimiento para las variedades Leidy Green, Domingo y Sangría respectivamente.

Altura de vitroplanta, número de nudos, de hojas, de ramificación y el grado de enraizamiento.

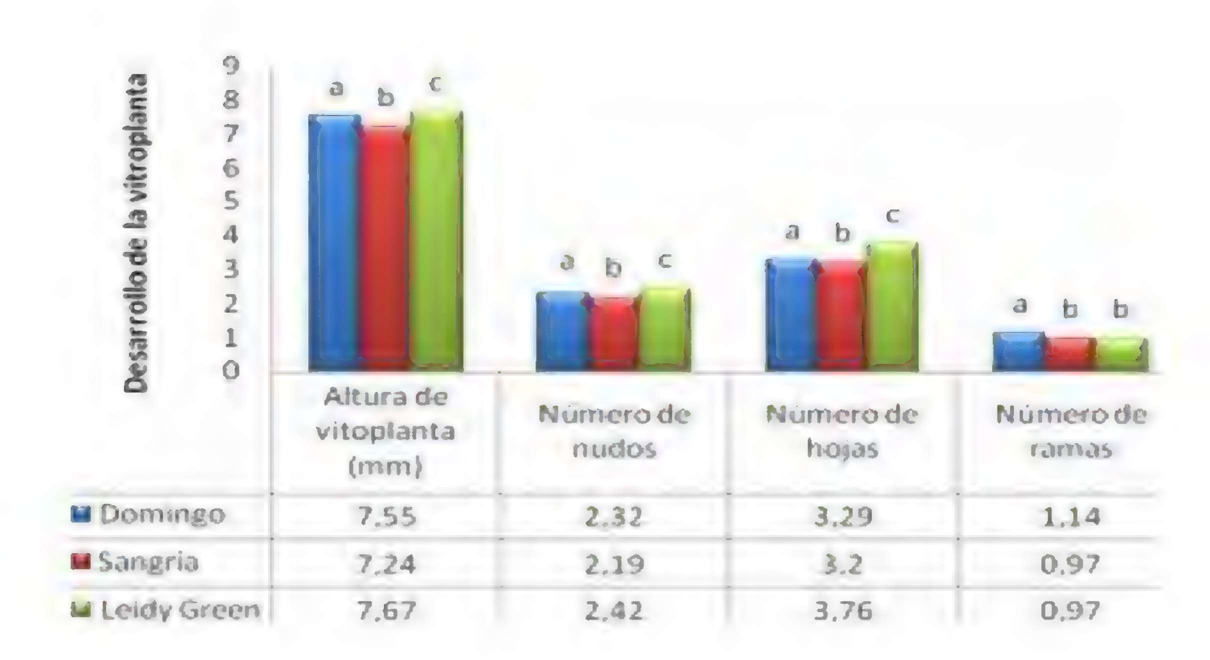
En la fase de aclimatación las vitroplantas de clavel tratadas con MS diluido al 50% para estimular el enraizamiento se obtuvo los resultados mas altos como ser altura (7,67mm), número de hojas (3,76 hojas) y numero de nudos (2,42) en la variedad Leidy Green obteniéndose el mejor desarrollo en la fase de aclimatación.

Cuadro N° 11. Comparación de medias del desarrollo en altura, número de nudos, de hojas, de ramas y el grado de enraizamiento en tres variedades de clavel. Se muestran los valores de las medias ± la desviación estándar.

Variedad	Altura (mm)	Número de nudos	Número de hojas	Número de ramas	Grado de enraizam.
Domingo	7.55 ± 2.97	2.32 ± 0.85	3.29 ± 1.24	1.14 ± 0.40	1.26 ± 0.55
Leidy Green	7.67 ± 2.57	2.42 ± 0.76	3.76 ± 1.19	0.97 ± 0.29	1.34 ± 0.47
Sangría	7.24 ± 1.49	2.19 ± 0.48	3.20 ± 0.98	0.97 ± 0.29	1.40 ± 0.46

Mediante la prueba de Duncan (5%) para las variables de estudio se determinó tres grupos estadísticamente diferentes. La variedad Leidy Green alcanzó la mejor altura de vitroplanta, el mayor número de nudos y de hojas respecto a las otras variedades. Se obtuvo mayor número de ramas en la variedad Domingo y el mayor grado de enraizamiento en la variedad Sangría. Este comportamiento desigual de las tres variedades de clavel, se atribuye a la gran capacidad de

adaptarse de la variedad Leidy Green a las condiciones de aclimatación respecto las variedades Sangría y Domingo.



Medias con letras iguales no difieren significativamente para $p < 0.05$

Gráfico N°41. Efecto del medio de cultivo MS diluido al 50% sobre la altura de vitroplanta (mm), número de nudos, hojas y ramas en fase de aclimatación en tres variedades de clavel.

Realizado el ANVA para las variables altura de vitroplanta, número de nudos, de hojas, de ramas y el grado de enraizamiento (Cuadro 15) se observa que el mismo no es significativo, esto se debe a que la variedad no influye directamente respecto a la aclimatación por lo que no se obtuvo diferencias en su desarrollo.

influyen de manera notable sobre el enraizaminto de vitroplantas donde al probar sustratos obtuvo un 85 % de enraizamiento en las vitroplantas de rosa. Esto pudo ser a efecto de la totípotencia de la planta debido a que en esta fase se implementó solo MS diluido al 50%.

4.4.5. TABLA 5, ANEXO 5

a) MEDIO DE CULTIVO

Se utilizaron 40 semillas para cada método, cada una de ellas fue colocada en tubos que contenían 12 mL de medio de cultivo compuesto por las sales de MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa (30 g/L) y Gelrite (2 g/L). Las plantas se mantuvieron por 35 días a 25±2 °C y luz artificial de 1000 lux de intensidad.

b) ANÁLISIS

LEJIA

Se evaluaron las siguientes variables cada 7 días durante dos semanas: porcentaje de semillas contaminadas, primer día de germinación, porcentaje de germinación, porcentaje de plantas con raíz, porcentaje de plantas con hojas.

Al realizar la primera evaluación, un total de 30 semillas habían germinado, lo que representa el 87.71 % (Tabla 12), cifra superior a la obtenida por Montes et al. (1997) en un estudio realizado para la propagación de cuatro variedades de claveles, entre ellas la analizada en este trabajo, para la cual se obtuvo un 62.0 % de germin Este bajo porcentaje de germinación probablemente se debió a que la esterilización efectuada por estos investigadores, dañó la cubierta de las semillas y el embrión, a pesar de haber empleado las mismas condiciones de desinfección que utilizamos en nuestro estudio. Este porcentaje de germinación también supera al obtenido en estudios realizados en claveles chinos, donde a los 10 días de sembradas la semilla solamente había germinado el 54.60 % de ellas en medio MS y fue muy inferior (49.34 %) en medio Knudson (Pinares et al., 2002). Del total de semillas germinadas a los siete días, el 71.43 % poseía raíces (Tabla 12), la mayoría de estas con una longitud de 1 cm aproximadamente. En esta primera evaluación se observaron plántulas con el

primer y segundo par de hojas, representando en total el 54.28 % de las sembradas (Tabla 12). Este resultado evidencia la calidad de las semillas y el efecto del medio utilizado, el cual favorece la germinación de las mismas y el rápido crecimiento y desarrollo de las plántulas.

CLORAMINA-T

los primeros indicios de germinación de las semillas se obtuvieron entre el tercer y cuarto días de la siembra, observándose la salida de las dos primeras hojitas y el ápice de la radícula. En la primera evaluación se obtuvo un porcentaje de germinación del 85 %, muy semejante al obtenido durante la desinfección con lejía (Tabla 12). En cambio, el porcentaje de plantas con raíz (42.5 %) en esta evaluación fue mucho menor con respecto al obtenido durante la desinfección con lejía. Sin embargo, se logró un mayor porcentaje de plantas con hojas: 67.5%.

En la segunda evaluación, en el método de desinfección con lejía la cantidad de semillas germinadas se mantuvo igual. Sin embargo, la cantidad de plántulas con raíces y con más de dos pares de hojas aumentó a un 80.0 % (Tabla 12). En esta fecha se comenzó a observar el tercer y cuarto par de hojas, resultados que coinciden con los obtenidos por Pinares et al. (2002) en claveles chinos, donde se observaron como promedio 4 y 8 pares de hojas a los 10 y 30 días de sembradas las semillas en el mismo medio utilizado en este estudio, lo que representa un mayor número de yemas a utilizar en la posterior propagación de las plántulas. En el método de desinfección con cloramina-T, en la segunda evaluación aumentó el porcentaje de semillas germinadas a un 88.70 %, igualmente aumentó el porcentaje de plantas con raíces a un 79.55 % y el porcentaje de plantas con hojas a un 81.24 %. A diferencia del método de

desinfección con lejía, este método de desinfección con cloraminaT se utiliza por primera vez en semillas de esta especie, ya que este desinfectante presenta determinadas ventajas sobre la lejía, como, por ejemplo: no es irritante ni corrosivo, es biodegradable y proporciona actividad y protección por períodos más prolongados que los desinfectantes a base de hipoclorito. De manera general, se considera que ambos métodos son efectivos para el establecimiento in vitro de semillas de clavel español, ya que lograron la desinfección del 100 % de las semillas y no inhibieron la germinación ni el posterior desarrollo de las plántulas, como se demuestra por los porcentajes de plantas con raíces y plantas con hojas tan similares que se obtienen ya en la segunda evaluación.

Tabla N° 12. Porcentajes de germinación, formación de raíces y de hojas de las plántulas obtenidas por ambos métodos de desinfección.

	1ra evaluación		2da evaluación	
Variables	Lejía	Cloramina-T	Lejía	Cloramina-T
% de germinación	87.71	85	87.71	88.70
% de plantas con raíces	71.43	42.5	80	79.55
% de plantas con hojas	54.28	67.5	80	81.24

4.4.6. TABLA 5, ANEXO 6

Para la formación de brotes, se utilizó medio MS en forma basal o se complementó con diferentes concentraciones de BAP que van desde 1-5 mg / l. Mejor La respuesta de formación de brotes se obtuvo en medio MS que contenía 4,0 mg/L de BAP. En esta concentración todos los explantes muestran brotes de respuesta dentro de los 7 días de inoculación tanto del meristemo apical como del nodal. Por aumento o disminución en la concentración de BAP no solo disminuyó la tasa de formación de brotes sino también se incrementó el tiempo

necesario para la inducción de brotes. Cuando se utilizó una combinación de 1,0 mg/L de BAP con diferentes concentraciones de Kinetina Se puede que mediante la adición de Kinetina se redujo la velocidad de formación de brotes. Cuando se utilizó 0,5 mg / l de Kinetina con 1,0 mg / l de BAP, se obtuvo 80% de formación de brotes. después de 11 días de inoculación de meristemo apical tallo y 70% después de 20 días de inoculación del explante nodal. Todas las demás concentraciones de Kinetina con la misma concentración de BAP no dio resultados satisfactorios para la formación de brotes en ambos tipos de explantes.

Para la multiplicación de brotes, se complementó el medio MS con BAP solo y en combinación con Kinetin. Se ejecutó el BAP con una concentración de 1,0 mg/L, se obtuvieron 25,2 brotes en total en todos los cultivos. Al aumentar la concentración de BAP se redujo la tasa de multiplicación de brotes y a 5,0 mg/L de BAP solo se formaron 10,4 brotes por cultivo. No se obtuvo una buena respuesta de la multiplicación de brotes cuando diferentes concentraciones de Kinetin se agregaron con 1,0 mg/L de BAP. La tasa de multiplicación de brotes disminuyó mediante el aumento de la concentración de Kinetina.

Desarrollo In vitro de plantas después de alcanzar el tamaño de 5,0 cm se cambiaron para enraizar In vitro. El medio de enraizamiento MS se complementó con NAA que van desde 1,0 mg/L a 5,0 mg/L. Se postula que la mejor respuesta para el enraizamiento fue obtenida cuando se utilizó 1,0 mg/L de NAA. Al aumentar la concentración de NAA, la respuesta de inducción de la raíz disminuyó y con 2,5 mg/L de NAA se obtuvieron resultados muy malos. Las plantas bien enraizadas después de dos semanas de cultivo se endurecieron en invernadero. La mejor respuesta al endurecimiento se obtuvo en una mezcla que

contenía arena + turba + suelo (1: 1: 1) a Nivel de humedad del 95% en condiciones de luz.

S. No.	Media	Composition	No. of explants cultured	Days for shoot formation		Mean number of cultures showing shoot formation	
				Apical	Nodal	Apical	Nodal
1.	MS1	MS Basal	10	19.6 ± 0.669^{a}	24.6 ± 0.726^{a}	2.2 ± 0.334^{e}	2.0 ± 0.4^{d}
2.	MS2	BAP 1.0 mg/l	10	14.0 ± 0.489^{b}	16.4 ± 0.456^{b}	3.0 ± 0.4^{d}	2.0 ± 0.282^{d}
3.	MS3	BAP 2.0 mg/l	10	10.2 ± 0.334^{c}	16.0 ± 0.4^{b}	5.0 ± 0.489^{c}	3.0 ± 0.282^{d}
4.	MS4	BAP 3.0 mg/l	10	9.4 ± 0.357^{c}	9.8 ± 0.657^{c}	8.4 ± 0.456^{b}	6.4 ± 0.456^{c}
5.	MS5	BAP 4.0 mg/l	10	6.2 ± 0.521^{e}	7.0 ± 0.489^{e}	10.2 ± 0.438^{a}	10.6 ± 0.669^{a}
6.	MS6	BAP 5.0 mg/l	10	7.2 ± 0.438^{e}	9.4 ± 0.456^{c}	8.2 ± 0.521^{b}	8.0 ± 0.282^{b}

Means followed by different letters in the same column differ significantly at p=0.05 according to Duncan's new multiple range test.

Table 1b. Effect of different concentration of BAP and kinetin on shoot formation.

S.No.	Media	Composition	No. of explants cultured	Days for shoot formation		Cultures showing shoot formation	
				Apical	Nodal	Apical	Nodal
1.	MS1	BAP 1.0 mg/l+ Kin 0.5 mg/l	10	11.2 ± 0.521^{d}	20.0 ± 0.632^{c}	8.2 ± 0.334^{a}	7.4 ± 0.219^{a}
2.	MS2	BAP 2.0 mg/l+ Kin 1.0 mg/l	10	15.2 ± 0.334^{c}	26.2 ± 0.769^{b}	5.4 ± 0.357^{b}	5.4 ± 0.456^{b}
3.	MS3	BAP 3.0 mg/l+ Kin 1.5 mg/l	10	15.0 ± 0.632^{c}	26.0 ± 0.692^{b}	4.0 ± 0.4^{c}	4.4 ± 0.219^{c}
4.	MS4	BAP 4.0 mg/l+ Kin 2.0 mg/l	10	20.2 ± 0.334^{b}	30.0 ± 1.356^{a}	2.2 ± 0.178^{e}	2.0 ± 0.282^{e}
5.	MS5	BAP 5.0 mg/l+ Kin 2.5 mg/l	10	22.2 ± 0.438^{a}	30.2 ± 1.035^{a}	3.4 ± 0.456^{d}	3.4 ± 0.219^{d}

Means followed by different letters in the same column differ significantly at p=0.05 according to Duncan's new multiple range test.

Table 2a. Effect of different concentrations of BAP on *In vitro* shoot multiplication.

S. No.	Media	Composition	Number of test tubes cultured	Number of multiple shoot formed	Days for shoot multiplication	Average shoot length (cm)
1.	MS1	MS Basal	10	7.4 ± 0.219^{e}	24.2 ± 0.769^{b}	3.4 ± 0.456^{b}
2.	MS2	BAP 1.0 mg/l	10	25.2 ± 0.521^{a}	16.2 ± 0.334^{e}	5.2 ± 0.593^{a}
3.	MS3	BAP 2.0 mg/l	10	19.4 ± 0.536^{b}	18.4 ± 0.456^{d}	4.4 ± 0.357^{ab}
4.	MS4	BAP 3.0 mg/l	10	12.2 ± 0.521^{c}	21.6 ± 0.920^{c}	4.4 ± 0.219^{ab}
5.	MS5	BAP 4.0 mg/l	10	12.0 ± 0.565^{c}	23.0 ± 0.565b^{c}	3.2 ± 0.178^{b}
6.	MS6	BAP 5.0 mg/l	10	10.4 ± 0.357^{d}	27.2 ± 0.521^{a}	3.4 ± 0.219^{b}

Means followed by different letters in the same column differ significantly at p=0.05 according to Duncan's new multiple range test

Table 2b. Effect of different concentrations of BAP and kinetin on *In vitro* shoot multiplication.

S. No.	Media	*Composition*	Number of test tubes cultured	Number of multiple shoot formed	Days for shoot multiplication	Shoot length (cm)
1.	MS1	BAP 1.0 mg/l + Kin 0.5 mg/l	10	9.4 ± 0.456^{a}	24.0 ± 0.632^{a}	5.4 ± 0.219^{a}
2.	MS2	BAP 1.0 mg/l + Kin 1.0 mg/l	10	7.6 ± 0.456^{b}	16.2 ± 0.593^{c}	4.0 ± 0.282^{b}
3.	MS3	BAP 1.0 mg/l + Kin 1.5 mg/l	10	4.4 ± 0.219^{c}	18.2 ± 0.334^{c}	4.2 ± 0.438^{b}
4.	MS4	BAP 1.0 mg/l + Kin 2.0 mg/l	10	2.2 ± 0.178^{d}	21.0 ± 0.8^{b}	3.4 ± 0.219^{b}
5.	MS5	BAP 1.0 mg/l + Kin 2.5 mg/l	10	2^{e}	23.4 ± 0.456^{a}	3.8 ± 0.334^{b}

Means followed by different letters in the same column differ significantly at P = 0.05 according to Duncan's new multiple range test

4.4.7. TABLA 5, ANEXO 7

Tabla N° 13. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de meristemos en clavel español (Dianthus caryophyllus L.).

Componente	1 (Control)	2	3	4
Macroelementos, microelementos y vitaminas de MS	+	+	+	+
AIA 1.5 mg L^{-1}	+	+	+	+
AG_3 1 mg·L^{-1}	+	+	+	+
KIN 0.8 mg·L^{-1}	+			
BB-16 0.1mg L^{-1}		+		
BB-16 0.01mg L^{-1}			+	
BB-16 0.001mg L^{-1}				+
Sacarosa 30 g·L^{-1}	+	+	+	+
Gelrite 2 g·L^{-1}	+	+	+	+
pH=5.7	+	+	+	+

Efecto de diferentes tratamientos de desinfección sobre la germinación de las semillas de clavel español

El porcentaje de germinación obtenido en la primera evaluación (a los 7 días), en el tratamiento control, fue del 87,5 % de las semillas.

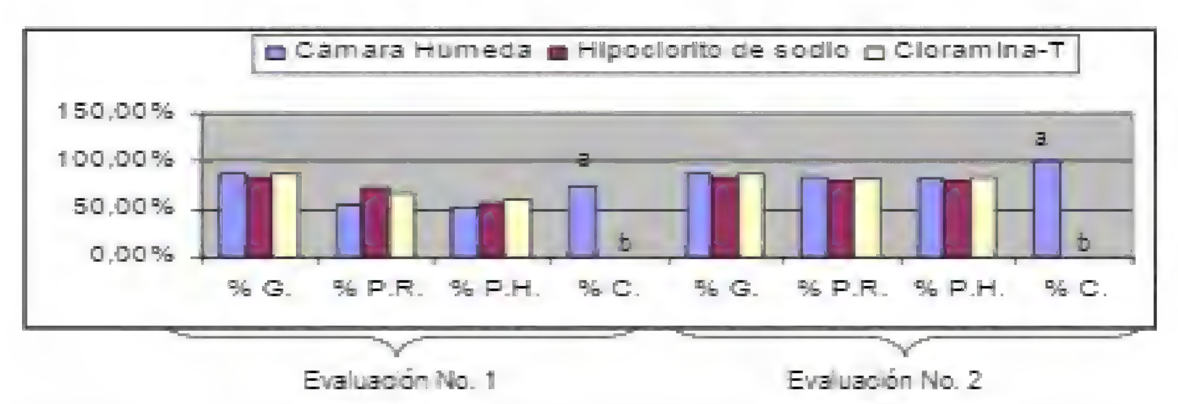


Gráfico N° 42. Porcentajes de germinación, plantas con raíces, plantas con hojas y contaminación obtenidos en las dos evaluaciones de cada ensayo de germinación de las semillas de clavel español (Dianthus caryophyllus L.).

En un experimento para el establecimiento de ápices caulinares menores de 5 mm de dos clones de ajo (Allium sativum L.), utilizando Biobrás-6 y Biobrás-16 como sustitutos del 6-BAP, se detectó que los mayores porcentajes de regeneración (83,3 % y 60,0 %) se obtuvieron con 0,05 mg·L-1 de Biobrás-6 combinados con 0,01 mg·L-1 de AIA, en comparación con la dosis de 0,01 mg·L-1 de Biobrás-16 combinados con 0,01 mg·L-1 de AIA, donde la regeneración fue del 60,0 % y el 43,3 %, sin diferencias con el control, por lo que se consideró que en este cultivo la citoquinina puede ser sustituida por el Biobrás-6.

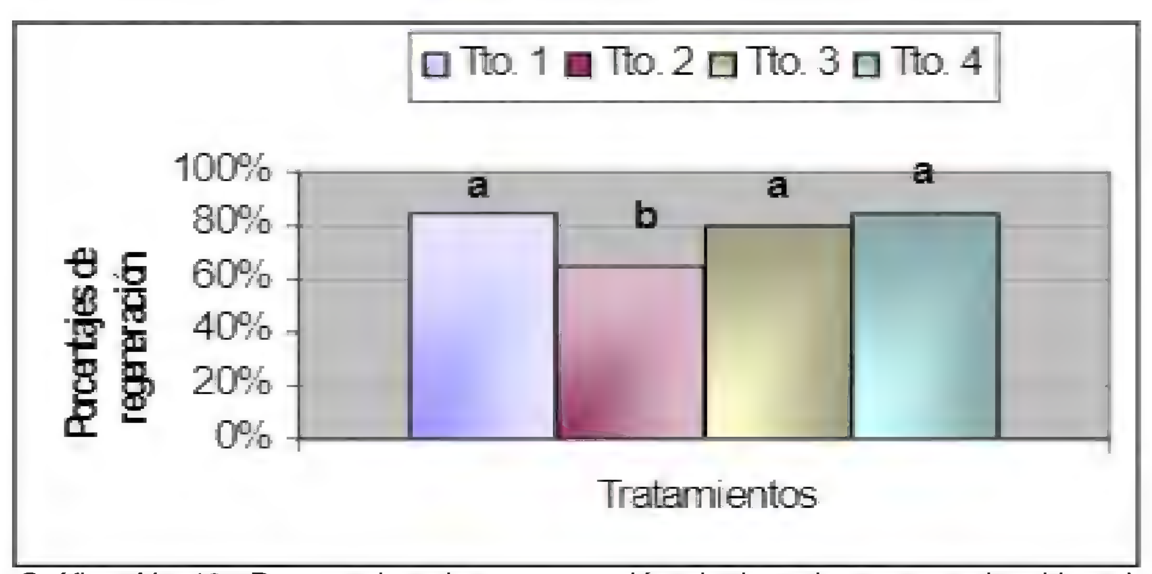


*Gráfico N° 43. Porcentajes de regeneración de las plantas en el cultivo de meristemos de clavel español (Dianthus caryophyllus L.).Sx: 0,417**

Para el número de nudos por planta no se encontraron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos en los que se empleó el Biobrás-16 y el tratamiento control, por lo que se considera que el empleo de este biorregulador en el medio de cultivo no incrementó la formación de nudos en las plantas obtenidas a partir del cultivo de meristemos. Similares resultados informaron Hernández, Moré y Núñez (1999) al realizar la micropropagación de plántulas de papa (Solanum tuberosum L.) con el empleo de Biobrás-6 y Biobrás-16. En este caso no se obtuvieron diferencias significativas en el número de nudos entre el tratamiento en el cual se utilizó el Biobrás-16 y el medio control, sin embargo, con el Biobrás-6 sí se obtuvo un número de nudos superior al control.

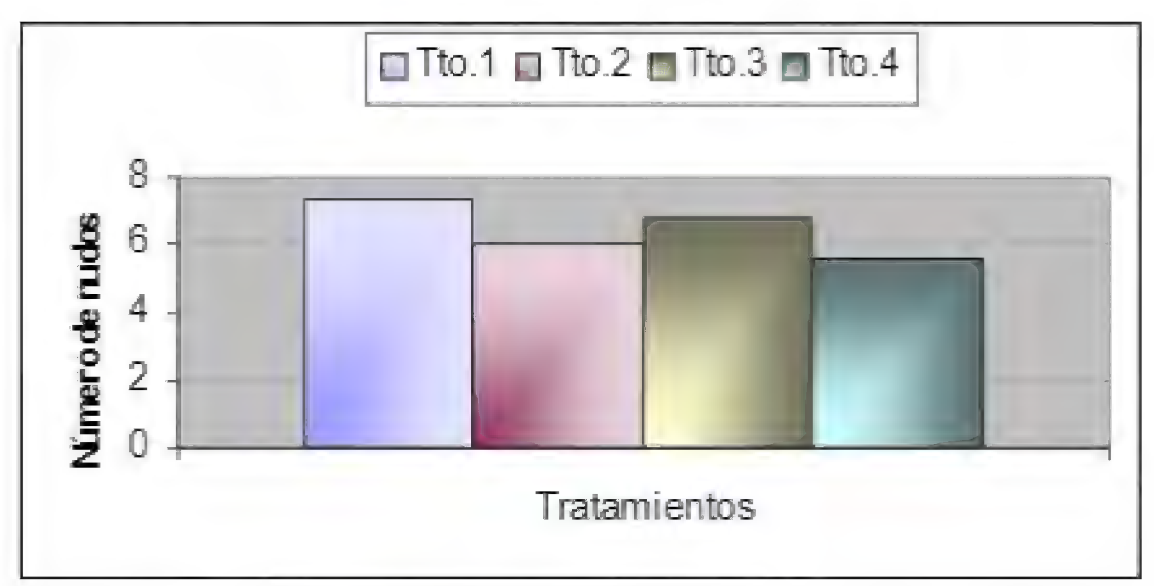


Gráfico N° 44. Número de nudos de las plantas en los distintos tratamientos evaluados del cultivo de meristemos de clavel español (Dianthus caryophyllus L.)

La presencia de raíz en la primera propagación de manera general no estuvo favorecida por el Biobrás-16, ya que los porcentajes de plantas con raíz se mantuvieron por debajo del 50 % . Solo en el tratamiento 2 (0,1 mg·L-1) se obtuvo un incremento en el número de plantas con raíces, con respecto al tratamiento 1 (control). Ha sido señalado por Khripach et al. (1999) que los resultados con

respecto al crecimiento de las raíces con el empleo de los brasinoesteroides son contradictorios, obteniéndose en algunos ensayos incrementó de los valores y en otra inhibición.

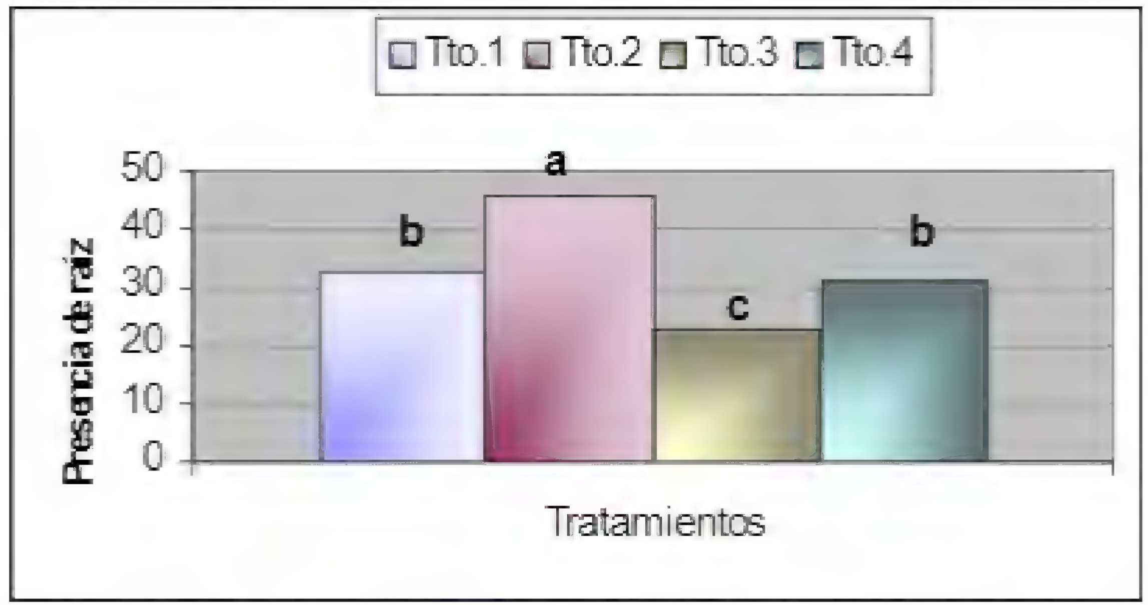


*Gráfico N° 45. Formación de raíz en las plantas obtenidas en la primera propagación por esquejes de clavel español (Dianthus caryophyllus L.). Sx: 0,262***

4.4.8. TABLA 5, ANEXO 9

a) MEDIO

Para inducir organogénesis directa, se llevaron a cabo diferentes ensayos que consistieron en usar medio base MS 4.4 g/l, 30 g/l de sacarosa, un pH de 5.8, y un fotoperiodo de 16 horas/ luz, y 6000 lux de intensidad lumínica, evaluando la combinación de diferentes hormonas (auxinas y citokininas), (Tabla 14), variando el grado de solidificación del medio desde 8 g/l hasta 0 g/l de agar.

Tabla N° 14. Ensayos con hormonas (mg/l), para inducción de organogénesis directa, evaluados a diferentes concentraciones de agar (g/l). ANA (1-ácido naftalenoacético), TDZ (tidiazuron), BAP (6-benzilaminopurina), todas las hormonas marca Sigma®.

No. Ensayo	ANA	TDZ	BAP	Agar g/l
1		0.05		0
2		0.50		2
3	0.30		0.30	4
4	0.10		0.30	6
5	4.00		2.00	8
6	4.00		4.00	8

b) ANÁLISIS

El análisis de varianza de los datos experimentales mostró que, el potencial organogénico, varia con la variedad de clavel utilizada en los experimentos y dependiendo de la concentración y tipo de reguladores de crecimiento utilizados y aún más varían con la concentración de agar en el medio de cultivo

Igualmente, se pudo observar que los mejores tratamientos hormonales para obtener una respuesta organogénica óptima en su orden son: el tratamiento 1, 4 y 2. Por otro lado, se encontró, que las mejores concentraciones de agar, para obtener una óptima respuesta en cuanto al número de brotes producidos, son de 0 y 6 g/l (Tabla 15). Los análisis de varianza sobre el número total de brotes organogénicos, arrojaron diferencias significativas entre las variedades y los tratamientos hormonales, pero no entre los diferentes grados de solidificación del medio. Al realizar las pruebas de Tukey, se pudo ver que la mejor respuesta en términos del número total de brotes organogénicos, se dio por parte de la

variedad Kaly; además, que los tratamientos en donde se obtuvo mayor número de brotes organogénicos directos, en su orden fueron el tratamiento 2, 1, 3 y 4 (Tabla 15). Con base en los resultados, se pudo evidenciar que, la regeneración de brotes organogénicos depende de las características genéticas de los explantes, factor relacionado con el balance de la concentración de los reguladores de crecimiento en el medio (TDZ, ANA, BAP).

Tabla N°15. Resultados de análisis de varianza para las dos variedades evaluadas Bagatel (B) y Kaly (K), de acuerdo a los tratamientos de concentraciones hormonales (parte superior de la tabla) y de concentración de agar (parte inferior de la tabla). En negrita resultados más significativos (Anava, P< 0.05), de acuerdo con la prueba de Tukey realizada. Solo se muestra el resultado superior en la comparación del comportamiento de la variedad Bagatel (B) y la variedad Kaly (K), si son iguales los valores aparecen KB.

Tratamiento con Hormonas Concentración en mg/l	No. Explantes con Organogénesis Directa	No. Total de Brotes Organogénicos Directos	No. Explantes Muertos
TDZ 0.05	**3.45 +/- 0.48 K**	**124.15 +/- 23.76 B**	5.12 +/- 0.48 K
TDZ 0.5	2.40 +/- 0.30 KB	**167.60 +/- 45.73 K**	6.60 +/- 0.36 B
ANA 0.3 BAP 0.3	2.30 +/- 0.39 KB	66.87 +/- 11.69 K	6.12 +/- 0.36 KB
ANA 0.1 BAP 0.3	2.43 +/- 0.37 KB	56.37 +/- 10.22 B	6.40 +/- 0.45 B
ANA 4.0 BAP 2.0	1.27 +/- 0.34 K	44.50 +/- 12.360 K	**8.12 +/- 0.39 K**
ANA 4.0 BAP 4.0	1.42 +/- 0.37 KB	51.27+/- 13.00 K	**8.27 +/- 0.39 K**
Concentración de Agar por Litro (g/l)	**No. Explantes con Organogénesis Directa**	**No. Total de Brotes Organogénicos Directos por explante**	**No. Explantes Muertos**
0	**3.77 +/- 0.44 K**	79.95 +/- 12.82 K	5.52 +/- 0.44 B
2	1.27 +/- 0.25 B	38.45 +/- 10.50 K	**7.41 +/- 0.36 K**
4	1.83 +/- 0.27 B	**134.83 +/- 37.44 K**	6.97 +/- 0.38 KB
6	2.29 +/- 0.31 KB	117.25 +/- 22.47 B	7.02 +/- 0.37 KB
8	1.80 +/- 0.40 B	54.90 +/- 11.70 B	7.05 +/- 0.41 KB

4.4.9. TABLA 5, ANEXO 10

Estas plántulas fueron seccionadas en esquejes de 1cm de longitud, a los que le fueron desprendidas las hojas. Los esquejes fueron sembrados en tubos de ensayo con 10 mL de medio Murashige-Skoog (MS) (1962) suplementado con 30 g•L1 de sacarosa y 2 g•L-1 de Gelrite, siguiendo un Diseño Completamente Aleatorizado.

De manera general, en la primera propagación por esquejes se obtuvieron elevados porcentajes de regeneración y diferencias significativas entre los porcentajes de regeneración de los diferentes tratamientos. El valor más elevado (95 %) se obtuvo en el tratamiento 4, en el cual fue empleada la menor concentración de Biobrás-16 (0,001 mg·L-1), lo que pudiera deberse a que estas fitohormonas son activas a muy bajas dosis, comparables con su contenido natural (Khripach et al., 1999). En el tratamiento control se obtuvo una regeneración del 90 %, seguido por los tratamientos 2 y 3, con un 75 % de regeneración (Gráfico 46).

Para el número de brotes, el mayor valor se obtuvo en el tratamiento 3 (Foto 1), con una media de 9,55 brotes por cada plántula obtenida. En el resto de los tratamientos se obtuvieron valores que variaron desde 6,1 en el control hasta 3,65 en el tratamiento 2 (Fig. 46), no difiriendo estadísticamente. En este caso, es de destacar que, aunque el tratamiento 3 resultó favorecido, se considera que la concentración endógena de Biobrás-16 que presentan los explantes fue suficiente para provocar la inducción de los brotes de las plántulas.

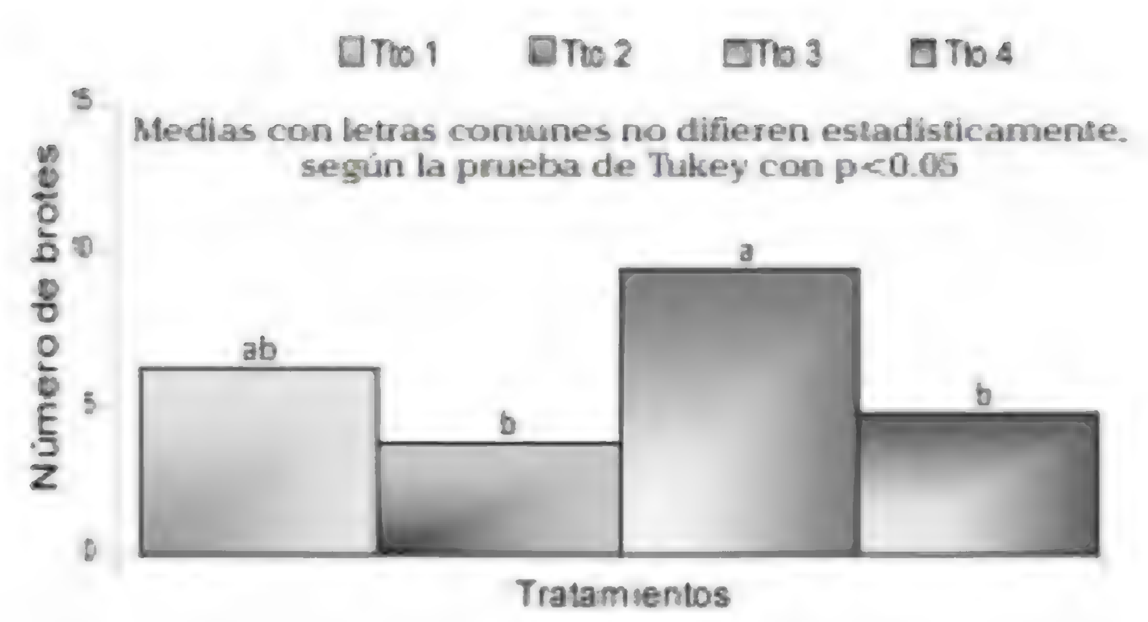


*gráfico n° 46. formación de brotes en las plantas obtenidas en la primera propagación por esquejes de clavel español (dianthus caryophyllus l.). s x 0,204**

a presencia de raíz en la primera propagación de manera general no estuvo favorecida por el Biobrás-16, ya que los porcentajes de plantas con raíz se mantuvieron por debajo del 50 % (Gráfico 47). Si lo en el tratamiento 2 (0,1 mg·L-1) se obtuvo un incremento en el número de plantas con raíces, con respecto al tratamiento 1 (control). Ha sido señalado por Khripach et al. (1999) que los resultados con respecto al crecimiento de las raíces con el empleo de los brasinoesteroides son contradictorios, obteniéndose en algunos ensayos incrementos de los valores y en otra inhibición.

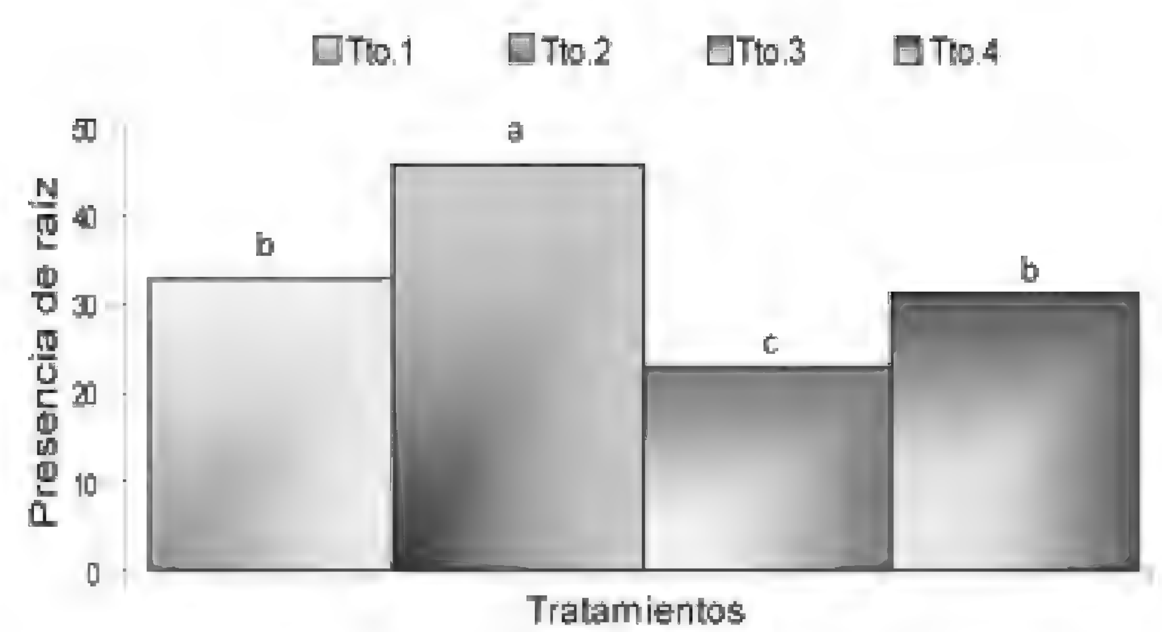


*Gráfico N° 47. formación de raíz en las plantas obtenidas en la primera propagación por esquejes de clavel español (dianthus caryophyllus l.). s x : 0,262***

4.4.10. TABLA 5, ANEXO 12

Plantas de clavel español previamente obtenidas in vitro a partir de la germinación de semillas, fueron tomadas como donantes de meristemos de 0,1 cm de longitud, los que fueron sembrados en medio de cultivo MS (19) con ácido indol-3 acético (AIA) 1,5 mg/L, ácido giberélico (AG3) 1 mg/L y kinetina (KIN) 0.8 mg.L-1 (tratamiento 1 o control) y en tres variantes de este medio, sustituyendo la KIN por diferentes concentraciones de Biobras-16: 0,1 mg.L-1 (tratamiento 2); 0,01 mg.L-1 (tratamiento 3) A Pérez, L. Comunicación personal. B Alvarenga, S. Laboratorio Cultivo de Tejidos I. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 2007, 76 p. Cultivos Tropicales, 2014, vol. 35, no. 1, p. 67-74 enero-marzo 69 y 0,001 mg.L-1 (tratamiento 4).

4.4.11. TABLA 5, ANEXO 13

Se utilizó el medio de cultivo MS con distintas concentraciones de sales minerales (%). Se realizaron cinco tratamientos, los cuales consistieron en

un control que contenía sales MS al 100% y reguladores de crecimiento, los otros cuatro contenían diferentes proporciones de sales de MS, a saber, 100, 75, 50 y 25% con el objetivo de disminuir la absorción de nutrientes por las plantas. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8.

Tratamientos: 1(sales MS al 100 %); 2 (sales MS al 75 %); 3 (sales MS al 50 %); 4 (sales MS al 25 %); 5 (sales MS al 100% + reguladores de crecimiento) / Tratamientos: 1 (100% MS sales); 2 (MS sales 75%); 3 (MS sales 50%); 4 (MS sales 25%); 5 (MS sales 100%+ reguladores de crecimiento). Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente para p<0,05 según prueba de Tukey.

JIMÉNEZ et al.: Conservación in vitro del clavel de flor estándar (*Dianthus caryophyllus* L.)

Cuadro 1. Conservación *in vitro* de *D. caryophyllus*, durante tres meses de cultivo en condiciones de crecimiento reducido. Granma, Cuba. 2012-2013

Table 1. *In vitro* conservation of *D. caryophyllus*, during three months of culture under conditions of reduce growth. Granma, Cuba. 2012-2013

Tratamiento¹	Supervivencia (%)	Longitud de la planta (cm)	Numero de yemas/explante	Numero de explantes enraizados	Coloración hojas	Senescencia foliar (%)
1 (100%)	96a	2.9 b	4.42 bc	25 a	Verdes	15 b
2 (75%)	96a	2.3 b	4.71 b	25 a	Verdes	14 b
3 (50%)	96a	2.11 b	3.88 cd	25 a	Verde pálido	25 a
4 (25%)	86b	2.05 b	3.41 d	22 a	Verde pálido	26 a
5 (100% + RC)	96a	3.73 a	5.36 a	25 a	Verdes	17 b
EE	0.36					

V. CONCLUSIONES

Podemos mencionar que los distintos métodos de propagación usados, nos permiten determinar la calidad y asepsia del cultivo in vitro, los métodos de desinfección se desarrollan de acuerdo al tipo de cultivo a realizar, de acuerdo a esto, varía, la proporción de soluciones a usar en un proceso de desinfección.

Así mismo, podemos mencionar que las soluciones más usadas en los distintos procesos de desinfección fueron el NaClO y Etanol, a su vez, las soluciones usados de manera discriminada fueron el Tween 20 y Tween 80; así como en raras ocasiones se utilizaron materiales de higiene personal, como detergente y/o jabón.

Por su parte, podemos destacar la importancia y utilidad del agua en un proceso de desinfección; ya sea agua de caño, destilada o esterilizada, esto permite el perfecto desarrollo de un proceso de desinfección porque parte del trabajo de remoción de partículas y agentes adheridos a cualquier material re remueve fácilmente mediante un enjuague.

El método de propagación in vitro para Dianthus caryophyllus, destacan tres; embriogénesis, organogénesis, cultivo de tejidos, cada uno de estos desempeñan un proceso diferente, en cuanto a la embriogénesis, este, se encarga de dar origen a una nueva planta o espécimen a través de una semilla, al cual conocemos que por naturaleza, da origen a un nuevo ser vivo vegetal; por su parte la organogénesis nos ayuda a comprender que, a partir de una porción de material vegetal (esquejes o segmento nodal), se dará origen a una nueva planta teniendo como principal meta formando órganos esenciales (hoja, yemas) para la función como tal; por último el cultivo de meristemos implica la

regeneración de un nuevo espécimen a partir de yemas axilares o tejidos meristemáticos propiamente dicho.

En cuanto a los medios de cultivo:

- La mayoría de los trabajos desarrollados compone dentro de su metodología, el uso de medio de Murashige-Skoogs, el cual se basa en la aplicación de distintas soluciones para lograr enraizamientos, crecimiento y desarrollo en los explantes.
- Podemos mencionar que distintas soluciones como el biobráss-16, son bastante eficientes, para mostrarnos resultados de formación de brotes y formación de raíces.
- En cuanto a la asepsia, los trabajos nos muestran que son bastante importantes, puesto que en múltiples ocasiones se puede presentar agentes patógenos en las muestras o explantes, por lo cual un buen lavado y desinfección serán cruciales en la determinación de resultados aceptables.
- La micropropagación de claveles nos ayuda a comprender que no necesariamente un floricultor, depende de plantas desarrolladas o producidas en viveros o invernaderos, sino que hay múltiples opciones de obtener plantas para cultivo en campo (Cultivo in vitro).

VI. Bibliografía

Aamir, A., Humera , A., Shagufta, N., Mamoona Rauf, & Javeg, I. (2008). UN PROTOCOLO EFICIENTE PARA PROPAGACIÓN IN VITRO DE Dianthus caryophyllus (Clavel). *Researchgate*, 111-121.

Afanador Perez, A. M. (2005). *PROPAGACIÓN in vitro A PARTIR DE MERISTEMOS DE CINCO VARIEDADES COMERCIALES DE Dianthus caryophyllus l. (Clavel).* Bogotá: Pontifice Universidad Javeriana.

Castilla Valdés, Y. (2008). *Micropropagación de clavel español (Dianthus caryophyllus L.) con el empleo de Biobrás-16.* La Habana: Universidad de la Habana.

Castilla, Y., & Gonzales, E. (2007). *EFECTIVIDAD DE DOS MÉTODOS DE DESINFECCIÓN EN EL ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE SEMILLAS DEL CLAVEL ESPAÑOL (Dianthus caryophyllus L.).* La habana: Researchgate.

Castilla, Y.; Pinares, A. y Xiqués, X. Estudio citogenético e isoenzimático de plántulas de clavel español (Dianthus caryophyllus L.) obtenidas por el cultivo in vitro de meristemos. En: Botánica Económica y Biotecnología Vegetal (Comisión 2: 2005, 20 al 22 de enero: Camagüey). Memorias del IX Encuentro de Botánica Johannes Bisse in Memoriam. Camagüey, 2005. ISBN 959-18-0005-3.

Filgueira Duarte, J. J., & Monroy Álvarez, I. E. (2010). ORGANOGENESIS DIRECTA EN MEDIO LÍQUIDO EN CLAVEL EN UN BIORREACTOR DE BAJO COSTO. *Univeridad de nueva granada*, 84-93.

Guevara Valencia, M. (2004). *Análisis comparativo entre las diferencias metodológicas de mricropropagación de variedades de clavel (Dianthus caryophyllus).* Córdova-Veracruz: Universidad Veracruzana (Facultad de ciencias biológicas y agropecuarias).

Montes, S.; Ramírez, L.; Hernández, M. M.; Santana, N.; Martínez, M. y Lara, D. Micropropagación de variedades de clavel (Dianthus caryophyllus L. y Dianthus plumarius L.) mediante el cultivo in vitro de meristemos. Cultivos Tropicales, 1997, vol. 18, no. 1, p. 75-81

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum. 15: 473-497.

Norberto Rodriguez, C., Pretel Sevillano, O., Reyna Sanchez, W., & Mercado Paredes, D. (2007). Efecto de 6-bencylaminopurina y acido-indolacético en la micropropagación in vitro de Dianthus caryophyllus "clavel". *Revista médica Vallejiana*, 132-138.

Pinares, A. 2002. Efecto del medio de cultivo en la germinación in vitro de semillas de claveles chinos (Dianthus chinensis L.) y en el desarrollo de las plántulas obtenidas. Libro Resumen del VI Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. p 75.

Quispe Flores, C. R. (2007). *COMPORTAMIENTO IN VITRO DE TRES VARIEDADES DE CLAVEL (DianthusY REDUCCIÓN DE LA FASE DE*

ENRAIZAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRE. La paz: Universidad Nacional Mayor de San Andrés.

Yantcheva, A., MA Viahova and A. Antanossov. 1998. Directo embriogénesis somática y vegetal regeneración del clavelDianthus caryophillus L.). Informes de células vegetales, 18: 148-15 *(1) (PDF) Un protocolo eficaz para la propagación in vitro del clavel (Dianthus caryophyllus).*. Availablefrom:https://www.researchgate.net/publication/216321465_An_Efficient_Protocol_for_In_vitro_Propagation_of_Carnation_Dianthus_caryophyllus#fullTextFileContent [accessed May 17 2021].